

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4001**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 15/57,**
C12N 1/21

(21) Paraiškos numeris: **IP1826**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 06 25**

(60) SU duomenys: **PCT/NL 88/00006, 1988 02 26 SU 4356795, 1988 10 26**

(31,32,33) Prioritetas: **87200356, 1987 02 27, NL**

(72) Išradėjas:

Christiaan Albertus Gerardus van Eekelen, NL
Johannes Cornelis van der Laan, NL
Leonardus Johannes Sofie Marie Mulleners, NL

(73) Patento savininkas:

GIST-BROCADES N. V., Wateringseweg 1, P. O. Box 1, 2600 MA Delft, NL

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Transformuotos prokariotinės šeimininko ląstelės gavimo būdas, ląstelė, stabili geno amplifikacija prokariotinių mikroorganizmų chromosominėje DNR

(57) Referatas:

Siūlomos transformuotos prokariotinės ląstelės receptinės, turinčios dvi ar daugiau DNR sekos kopijų, stabiliai besilaikančių jų chromosomoje. Minėta DNR seka turi geną, koduojantį norimą polipeptidą, ir sekos kopijos atskirtos endogeninėmis chromosominėmis DNR sekomis. Taip pat siūlomas minėtų transformuotų receptinių kamienų paruošimo būdas. Minėti transformuoti receptiniai kamieniai pasižymi žymiai didesne norimo polipeptido produkcija negu žinomi polipeptidiniai kamieniai, jau produkuojantys norimą polipeptidą. Pristatomos receptinės ląstelės yra Bacillus novo species PB 92, produkuojančios aukšto šarmingumo proteolitinį fermentą ir Bacillus licheniformis T5, produkuojančios termostabilią alfa-amilazę, o taip pat išvardintų kamienų mutantai ir variantai. Pasiūlyti polipeptidai ir proteazė, koduojama geno, kilusio iš Bacillus PB92, ir alfa-amilazė, koduojama geno, kilusio iš Bacillus licheniformis T5 kamieno.

Šio išradimo sritis priskiriama prokariotinėms ląstelėms, kuriose gauta stabili geno amplifikaciją panaudojant ne mažiau dviejų tam tikros sekos DNR kopijų išsklaidytą netandeminį įterpimą į aukščiau paminėtos prokariotinės ląstelės chromosomą.

Bacilos plačiai naudojamos pramoninių fermentų, tokių kaip alfa-amilazė, neutrali proteazė ir šarminė ar serino proteazės, gamybai (žr. Debado "Bacilų panaudojimas pramonėje" knygoje "Bacilų molekulinė biologija", Acad. Press, New York, 1982).

Bacillus fermentų gamybos tobulinimas galimas tiek panaudojant klasikinius genetinius būdus, tokius kaip mutacijos ir po jų sekanti selekcija, tiek ir šiuolaikinius molekulinius-biologinius būdus. Paskelbta keletas homologinių ir heterologinių genų aukšto lygio ekspresijos tam tikruose prokariotiniuose ir eukariotiniuose organizmuose pasiekimo būdų, tam tikslui panaudojant genetinę inžineriją.

Vienas iš geno aukšto lygio ekspresijos pasiekimo būdų yra geno papildymas efektyviomis reguliacinėmis sekomis. Kitas būdas, dažnai naudojamas derinyje su pirmuoju, yra reikiamo geno kopijų pagausinimas. Pirmiausia amplifikacija gaunama įterpiant daugiakopijinę nechromosominę DNR molekulę tokią kaip plazmidė. Tačiau norint panaudoti plazmides kaip vektorius genetinės informacijos ekspresijai ir amplifikacijai žymia kliūtimi yra jų nestabilumas. Amplifikuoto geno stabilumas yra būtina sąlyga norint išlaikyti ekspresijos produkto, kurį koduoja amplifikuotas genas, aukštą produkcijos lygį, kadangi ląstelės turi daugelį kartų pasidalinti, kol susidarys pakankama biomasė, reikalinga norimo produkto didelei gamybai.

Yra dvi nestabilumo formos: segregacinis nestabilumas, kuomet plazmidė prarandama kultivavimo metu, ir struktūrinis nestabilumas, kuomet įvyksta kai kurių plazmidės rajonų delecija. Segregacinis nestabilumas gali pasireikšti, pavyzdžiui, tada, kuomet ląstelė-recipientė turi vektorių, nešantį geną, pasižymintį stipria ekspresija. Apskritai, tokiu atveju pasireikš selekcinis spaudimas ląstelėms, prarandančiom, sugebėjimą superekspresuoti geną, kadangi superekspresija yra nepageidautina transformuotos ląstelės-receptientės savybė. Geno superekspresuotam produktui išseikvojama daug metabolinės energijos, o tai neigiamai veikia ląstelės konkurentinį sugebėjimą (augimo greitis) palyginus su ląstelėmis-recipientėmis, kurioms tokia superekspresija nebūdinga.

Būdas, kurį panaudoja segregacinio nestabilumo išvengimui, grindžiamas atranka ląstelių, turinčių daugiakopijines plazmidės, nešančias genus, suteikiančius plazmidę turinčiai ląstelei pirmenybę, pavyzdžiui, atsparumą antibiotikui. Tuomet į fermentinę terpę pridėjus atitinkamo antibiotiko, galima atrinkti šias atsparias ląsteles. Tačiau stambiamastės pramoninės gamybos procesuose antibiotikai paprastai nėra naudingos atrankos priemonės, kadangi jie gali neigiamai veikti fermentinį procesą ar patį produktą.

Kitas būdas, naudojamas plazmidės praradimo, kurį sąlygoja segregacinis nestabilumas, sumažinimui, grindžiamas svarbaus ląstelei-recipientei funkciniu požiūriu geno įterpimui į vektorinę molekulę (Ferrari ir kt., Biotechnology, 3 (1985) 1003-1007). Tačiau šis metodas nelaiduoja vektoriaus struktūrinio stabilumo.

Būdai, naudojami struktūrinio plazmidės nestabilumo problemai išspręsti, grindžiami geno ekspresijos eksponentinėje augimo fazėje išvengimui. Pavyzdžiui, tam

tikslui panaudojamos reguliacinės sekos, tokios kaip temperatūrai jautrios reguliacinės sekos, o taip pat galima įterpti egzogeninę DNR į ląstelės-recipientės chromosomą. Kiti naudojami būdai grindžiami tuo, kad

5 vengiama panaudoti autonomiškai besireplikuojančias vektorines molekules, o vietoje to naudojami būdai, palengvinantys įvestos DNR įsiterpimą į ląstelės-recipientės chromosomą.

10 Svetimos DNR įterpimo į ląstelės-recipientės chromosomą būdai grindžiami homologine rekombinacija ir netaisyklinga rekombinacija. Yra du DNR sekų įterpimo į atitinkamą vietą chromosomoje būdai, panaudojant homologinę rekombinaciją: Campbell tipo ir dviguba

15 reciprokinė rekombinacija. Šie būdai parodyti atitinkamai Fig. 1A ir Fig. 1B. Trečias DNR sekų įterpimo į chromosomą būdas - tai būdas, naudojantis dviejų stadijų pakeitimo mechanizmą. Jis parodytas Fig. 1C. Iš esmės čia panaudojama Campbell tipo rekombinacija,

20 tačiau jos galutiniu rezultatu yra chromosoma, neturinti duplikuotų sekų. Tuo pačiu metu chromosomos rekombinuotoje dalyje nėra amplifikuoto vieneto. Tokiu būdu šis procesas panašus į dvigubą reciprokinę rekombinaciją.

25 Svetimos DNR įterpimui į chromosomą be homologinės rekombinacijos galima naudoti netaisyklingą rekombinaciją. Integruotos vektorinės molekulės gali būti atrinktos parenkant tokias sąlygas, kurios slopintų neintegruotų vektorinių molekulių replikaciją. Netaisyklingos replikacijos panaudojimas įterpimui pavaizduotas

30 Fig. 1D. Tai, kad gautuose chromosominiuose dariniuose nėra tandeminių duplikacijų, būdams, parodytiems Fig. 1B, C ir D, suteikia privalumą naudojant juos stabiliam DNR sekų įterpimui į genomą. Genai, įterpti į chromosomą, gali būti tiek homologiniai, tiek ir heterogeniniai genai. Įterptos į chromosomą DNR amplifi-

35

kacija vykdoma tandemine tvarka. Skelbiama, kad šie chromosomoje amplifikuoti genai yra nestabilūs, nors kartais pasitaiko darbų, rodančių šių genų stabilumą. Tokiu būdu, pageidautina surasti metodus, kurių pagalba
5 DNR, įterpta į chromosomą, liktų stabili.

Literatūros apžvalga

Egzogeninės DNR įterpimas į Bacillus subtilis chromosomą homologinės rekombinacijos būdu aprašytas Duncan ir kt. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3664-3668, o į Anacystis hidulans - Williams ir Szalay, Gene, 24, (1983) 37-51 ir Tarptautinėje patento paraiškoje W0084/00381. Paraiškoje EP-A-0127328 aprašytas heterologinio geno, negalinčio stabiliai išsilaikyti plazmidinio vektoriaus sąstata, įterpimas į mikroorganizmo chromosomą panaudojant homologinę rekombinaciją.
10
15

Paskelbti duomenys apie tiek homologinių, tiek heterologinių genų, įterptų į chromosomą, amplifikaciją. Žr., pavyzdžiui: Saito ir kt. Ketvirtuo tarptautinio simpoziumo pramoninių mikroorganizmų klausimais medžiaga, Kioto, Japonija, 1982, p.125-130; Youny, J. Gen. Microbiol., 130 (1984) 1613-1621; Jeanniere ir kt. Gene 40, (1985) 47-56; Surgent ir Benett, J. Bacteriol. 161, (1985) 589-595; Guttererson ir Koshland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, (1983), 4894-4898; Hashiguchi ir kt., Agric. Biol. Chem. 49, (1985) 545-550; Wilson ir Morgan, J. Bacteriol. 163, (1985), 445-453; prancūzų patentinė paraiška Nr. 84.06701; ir EP-A-0134048.
20
25
30

Taip pat aprašyta spontaninė amplifikacija prokariotinėse ląstelėse. Žr., pavyzdžiui, apžvalgą Anderson ir Roth, Ann. Rev. Microbiol. 31, (1977) 473-505.
35

Visais aukščiau aprašytais atvejais į chromosomą įterptos DNR amplifikacija vykdyta tandemine seka. Skel-

biama, kad šio tipo chromosominė sekos amplifikacija yra nestabili, nors kai kuriais atvejais stebėtas žymiai didesnis stabilumas negu aprašyta Janniere ir kt., *Gene*, 40, (1985), 47-55.

5

- Yra duomenų apie gamtinių amplifikuotų prokariotinių genų stabilizaciją, kuri atsiranda dėl svarbių genų, esančių tarp šių amplifikuotų sekų. Pavyzdžiui, B. subtilis esantys du tandemiškai išsidėstę ribosominės RNR geno 9-10 kopijų rinkiniai yra atskirti tRNR genų klasteriu (Waumausen ir Hansen, *J. Biol. Chem.* 258, (1983), 291-298. Kitais atvejais tiek E. coli, tiek B. subtilis sutinkami gamtiniai tandemiškai pasikartojantys ribosominės RNR operonai buvo deletuoti, ir tai turėjo nedidelę įtaką organizmo fenotipiniams ypatumams: atitinkamai Elwood ir Momura, *J. Bacteriol.* 143, (1980), 1077-1080 ir Houghney ir kt. *J. Bacteriol.* 154, (1983) 525-532.
- 20 Hofemeister ir., *Mol. Gen. Genet.* 189 (1983) 58-63 ir Prozorov ir kt. *Gene* 34, (1985), 39-46 aprašė plazmidės įterpimą į B. subtilis chromosomą tam tikslui panaudojant netaisyklingą rekombinaciją.
- 25 Sėkmingai klonuoti keletas bacilų ekstralastelinių fermentų genų, tokių kaip alfa-amilazės genai, išskirti iš B. amyloliquefaciens (Pulva ir kt. *Gene*, 15, (1981), 43-51), iš B. licheniformis (Ortlepp, *Gene* 23 (1983), 267), iš B. stearothermophilus (Mielenz ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, (1983), 5975-5979; EP-A-0057976) ir iš B. subtilis (Yang ir kt. *Nucleic Acids Res.* 11, (1983), 237); levansukrazės genas, išskirtas iš B. subtilis (Gay ir kt., *J. Bacteriol.* 153, (1983), 1424); genai, koduojantys neutralią proteazę, išskirti iš B. stearothermophilus (Fuji ir kt. *J. Bacteriol.*, 156, (1983), 831), iš B. amyloliquefaciens (Honjo ir kt., *J. Biotech.*, 1, (1984), 165) ir iš B. subtilis
- 35

(Yang ir kt., J. Bacteriol., 160, (1984), 115); genai, koduojantys serininę ar šarminę proteazę, išskirti iš B. subtilis (Wong ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, (1984), 1184), iš B. licheniformis (Jacobs ir kt. 5 Nucleic Acids Res., 13, (1985), 8913) ir iš B. amyloliquefaciens (Wells ir kt., Nucleic Acids Res. 11, (1983), 7911).

Paskelbti duomenys apie kai kurių gramteigiamų mikro- 10 organizmų protoplastų transformaciją. Chang ir Cohen (Mol. Gen. Genet. 168, (1979), 111-115) aprašė B. subtilis protoplasto transformaciją, kuri šiuo metu plačiai naudojama. Aprašytas panašus sėkmingas B. megaterium protoplasto transformacijos būdas (Vorobjova 15 ir kt., FEMS Microbiol. Letters, 7, (1980), 261-263), B. amyloliquefaciens (Fisher ir kt., Arch. Microbiol. 139, (1981), 213-217), B. sphaericus (McDonald, J. Gen. Microbiol., 130, (1984), 203), ir B. larvae (Bachiet ir kt., Appl. and Env. Microbiol. 49, (1985), 577). Toje 20 pačioje publikacijoje pranešta apie neigiamus rezultatus, gautus dirbant su B. papillae. Šis būdas buvo sėkmingas taikant jį B. polymyxa, B. licheniformis, B. macerans, B. laterosporus, tačiau nedavė teigiamų rezultatų B. coagulans, B. cereus ir B. pumilus atvejais, 25 nors ir buvo stebimas geras protoplastų susidarymas (Mann ir kt., Current Microbiol. 13, (1986), 131-135).

Kiti DNR įterpimo į protoplastus būdai grindžiami suliejimu su liposomomis, turinčiomis DNR (Holubova, Folia 30 Microbiol. 30, (1985), 97), arba protoplasto suliejimu su lengvai transformuojamu organizmu kaip tarpine ląstelė-recipiente (EP-A-0134048).

Trumpas išradimo turinys

35

Siūlomos prokariotinės ląstelės-recipientės ir jų paruošimo būdai, kurių pagrindą sudaro DNR sekos, koduo-

jančios norimą peptidą, ne mažiau dviejų kopijų stabilus įterpimas į ląstelės-recipientės chromosomą. Svetimos DNR sekos stabilus išlaikymas pasiekiamas įterpiant į ląstelės-recipientės chromosomą dvi ir daugiau sekos kopijas, kurios tarpusavyje atskiriamos endogeninės chromosominės DNR sekomis.

Trumpas figūrų iliustracijų aprašymas

Fig. 1A-D schematiškai pavaizduoti keturi nechromosominės DNR sekų įterpimo į prokariotinių organizmų chromosomą būdai.

T - seka-taikinys, tai yra chromosomoje ir plazmidėje esančios DNR sekos, tarp kurių gali vykti homologinė rekombinacija.

S - DNR seka, kurią reikia įterpti į chromosomą.

M - rekombinantinio kamieno atrankai naudojamo markerinio geno seka.

Fig. 2A ir 2B schematiškai pavaizduoti du geno stabilios amplifikacijos prokariotinėje chromosomoje gavimo būdai.

Fig. 3 parodyti histidin/MOPS gel-elektroforezės rezultatai, gauti tiriant B. subtilis DB104, turinčios pB110 arba pM58, kultūros supernatantą ir lyginant su kai kuriais subtilizinais:

1 takelis: Carlsberg subtilizinas

2 takelis: Bacillus PB92 proteazė

3 takelis: Bacillus subtilis subtilizinas

4 takelis: Bacillus subtilis DB104 (pM58)

5 takelis: Bacillus subtilis DB104 (pnB110)

5 Fig. 4 pavaizduota plazmidės pM58 restrikcinė karto-
grama. Be to, paveikslėlio viršutinėje dalyje parodyta
sekvenavimo strategija. Ištisinės linijos su strėlė-
mis - tai fragmentai, klonuoti fago M13 vektoriuose
mp 10, mp 11 ir mp 18. Apatinėje paveikslėlio dalyje
10 pavaizduota sekvenavimo strategija, panaudojant dešimt
oligonukleotidų, išdėstytų proteazės gene vienodais
tarpais.

15 Fig. 5 pavaizduota koduojančios grandinės nukleotidinė
seka, atitinkanti Bacillus PB92 serininės proteazės
aminorūgščių seką. Taip pat parodyti promotoriai (P1,
P2), ribosomų surišimo saitas (rbs) ir DNR sekos ter-
minacijos rajonai (term). Sunumeruotos ištisinės lini-
jos nurodo sekvenavimui naudotų dešimties oligonukleo-
20 tidų išsidėstymo vietą.

Fig. 6A pavaizduotas plazmidės pE194-neo konstravimas.

25 Fig. 6B pavaizduotas plazmidės pMAX-4 konstravimas.

Fig. 7A pavaizduotas radioautografas, gautas atlikus
sekantį tyrimą:

30 kamienų PB92, PBT109 ir PBT108 chromosominės DNR skal-
domos Hind 111, po elektroforezės 0,5 % agarozės gelyje
produktai pernešami ant nitroceliuliozės ir hibridinami
pagal Southern su nik-transliacija 32P pažymėta pM58
DNR.

35 Fig. 7B ir 7C parodoma integracija, gauta panaudojant
homologinę (B) rekombinaciją ir netaisyklingą (C) re-
kombinaciją tarp pMAX-4 ir Bacillus PB92 chromosomos.

Fig. 8 parodytas integracinio vektoriaus pElatB konstavimas.

5 Fig. 9A iliustruoja plazmidės pElatB įterpimą į B. licheniformis kamieno T9 chromosomą, tuo būdu gaunant B. licheniformis kamieną TB13.

10 Fig. 9B iliustruoja B. licheniformis kamienų TB13 ir T5B rekombinaciją, suliejant šių kamienų protoplastus ir po to gaunant B. licheniformis kamieną T13F.

Fig. 10 parodoma devynių skirtingų kolonijų, gautų po kamieno T13 poveikio fermentais, aprašyto 11 pavyzdyje, chromosominė analizė. Išskirta chromosominė DNR veikiamą Eco R1, elektroforetiškai frakcionuojama 0,8 % agarozės gelyje ir pernešama ant nitroceliuliozės. Po to hibridinama su nik-transliacija 32P pažymėta pElatB DNR. Piešinyje - radioautografas. Viršutinė strėlė rodo poziciją, į kurią migruoja 15000 bazių porų ilgio Eco R1 DNR fragmentas, turintis pilną pElatB seką, kuri buvo įterpta į chromosomą dalyje, nesančioje šalia pradinio alfa-amilazės geno, priešingai tam, kaip tai buvo padaryta kamieno TB13 atveju, kuris pavaizduotas Fig. 9A. Apatinė strėlė rodo poziciją, į kurią migruoja 33000 bazių porų ilgio Eco R1 DNR fragmentas, turintis visą alfa-amilazės geną, iš pradžių buvusį B. licheniformis T5 kamieno (žr. taip pat Fig. 9B). Analizuoti sekantys DNR pavyzdžiai:

30 1 takelis: Bacillus licheniformis T5 DNR

2 takelis: Bacillus licheniformis TB13 DNR

3 takelis: Bacillus licheniformis T390 DNR

4 takelis: DNR, išskirta iš neomicinui jautraus Bacillus licheniformis kamieno T390, paveikto fermentais, kaip tai aprašyta 12 pavyzdyje.

5 5 takelis: Bacillus licheniformis T13F DNR

6-14 takeliai: 9 skirtingų kolonijų, išskirtų iš kamieno T13F paveikus fermentais, kaip tai aprašyta 12 pavyzdyje, DNR.

10

Pavyzdžiai

Šis išradimas siūlo prokariotines ląsteles, jų paruošimo būdus, pagal kuriuos dvi ar daugiau DNR sekų kopijų stabiliai įterpiamos į chromosomą. Ląstelė-recipientė, į kurią įterpiama DNR seka, koduojanti norimą polipeptidą, yra transformuojama panaudojant DNR konstrukciją, turinčią aukščiau paminėtą DNR seką. Po to atrenkamos transformuotos ląstelės, kuriose įterptos DNR sekos atskirtos endogeninėmis chromosominėmis sekomis.

Paprastai endogeninės tarpinės sekos yra svarbios ląstelei-recipientei. Amplifikuotų sekų praradimas dėl homologinės rekombinacijos bus letališkas ląstelei-recipientei. Tokiu būdu pasireikš selekcinis spaudimas ląstelėms, turinčioms amplifikuotas sekas, ir nereikės naudoti antibiotikų ar kitų panašių atrankos priemonių. Įterpti galima panaudojant homologinę rekombinaciją arba netaisyklingą rekombinaciją. Fig. 2A ir 2B pa-
vaizduoti būdai, kuriuos galima panaudoti norimų ląstelių gavimui.

Naudojant homologinę rekombinaciją, vektorinėse molekulėse gali būti tarpai, homologiški ląstelės-recipientės chromosomai, ypač jeigu viena ar daugiau amplifikuoto geno kopijų jau įterpta į ląstelę-recipientę. Tokiu būdu, vektorinė molekulė gali turėti savo su-

detyje norimą DNR seką, seką-DNR taikini ir marketinę DNR seką.

5 Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad atrenkamos tik norimos rekombinantinės chromosominės struktūros. Tai pasiekama naudojant rekombinacijai linijines DNR molekules. Žiedinė vektorinė molekulė, kurią reikia įterpti, skaldoma restrikciniais fermentais homologijos su
10 įterpimas vyks pasirinktinai šioje specifinėje vietoje. Be to, kai norima DNR seka yra vektorinėje molekulėje, ji taip pat gali būti ir ląstelės-recipientės chromosomoje. DNR seka gali būti ląstelei-recipientei endogeninė arba gali būti įterpta į recipientės chromosomą pradinėje transformacijos stadijoje.
15

Sekas-taikinius netandeminei genų amplifikacijai geriau parinkti iš nereikšmingų genų tarpo. Pavyzdžiui, kai recipientiniai organizmai yra Bacilli, tuo atveju sekomis-taikiniais galima panaudoti genus, koduojančius
20 ekstra ląstelinius fermentus arba sporuliacijos genus. Kaip taisyklė, DNR sekų įterpimas į šiuos genus iššauks pastarųjų inaktyvaciją. Geno ekspresijos netekimas gali būti patikrintas ir panaudotas norimų rekombinantinių kamienų atrankai.
25

Chromosominio geno amplifikacijai naudojant netaisyklingą rekombinaciją, kaip tai parodyta Fig. 1D ir 2A, geriau parinkti tokias įterpimo ir atrankos sąlygas, kuriose homologinė rekombinacija neviršija netaisyklingos rekombinacijos. Homologinės rekombinacijos galima išvengti transformuojant pirmą ir antrą ląsteles-recipientes, neturinčias norimo struktūrinio geno. Tam tikslui panaudojamas vektorius, turintis DNR seką, koduojančią norimą polipeptidą ir markerinį geną. Po to
30 pirmoji ir antroji ląstelės-recipientės, kuriose DNR seka yra skirtingose chromosomos vietose, gali būti at-
35

rinktos ir sujungtos suliejant. Tokiu būdu gaunama transformuota ląstelė, turinti ne mažiau dviejų DNR sekų, koduojančių norimą struktūrinį geną, išdėstyta skirtingose antrosios ląstelės recipientės genomo vietose. Norint palengvinti atranką, pirmoji ląstelė-re-

5 recipientė prieš suliejimą turi būti užmušta.

Interesuojantis genomai (kuriame yra norimi genai) gali būti iš prokariotinės arba eukariotinės ląstelės. Šie

10 genai gali būti: bakteriniai genai, vienaląsčių mikroorganizmų genai, žinduolių genai ir pan. Struktūrinius genus galima paruošti įvairiais būdais, panaudojant tame tarpe sintezę, genomines DNR išskyrimą, cDNR paruošimą arba jų rekombinaciją. Įvairūs manipuliacijų su

15 genais būdai gerai žinomi. Tai: restrikcija, iškirpimas, ligavimas, mutagenezė in vitro, pirminė reparacija, linkerių ir adapterių panaudojimas ir pan. Tokiu būdu gautos DNR sekos gali būti apdorotos įvairiais būdais, parinktais pagal DNR konstrukciją (Maniatis ir kt., "Molekulinis klonavimas", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982).

20

Struktūriniai genai gali ekspresuoti daugelį polipeptidų ir baltymų, tokių kaip fermentai, hormonai, limfokinai, paviršiaus baltymai, kraujo baltymai, statybiniai baltymai, imunoglobulinai ir pan., priklausančių žinduoliams, vienaląsčiams mikroorganizmams, pvz., grybų bakterijoms tokioms kaip mielės, hifiniai grybai, jūrų dumbliai, pirmuonys ir t.t., o taip pat jie gali būti augalinės bei kitokios kilmės. Ypatingo dėmesio susilaukia fermentai, tame tarpe proteazės ir amilazės. Tokių fermentų pavyzdžiu gali būti serininės ir neserininės proteazės. Pastarųjų tarpe - labai šarmingos serininės proteazės, alfa- ir beta-amilazės ir pan. Serininių proteazių geras šaltinis yra Bacillus novo species PB92, o alfa-amilazės- T5 B. licheniformis, bei šių kamienų variantai ir mutantai.

25

30

35

Geną kaip sudėtinę atitinkamo vektoriaus dalį galima gauti įvairiais žinomais šiuolaikiniais būdais. Paprastai, iš organizmo, ekspresuojančio labai šarmingą proteazę, paruošiama genomine biblioteka. Pastarąją patogiu paruošti liguojant donorinio kamieno DNR fragmentus prie tinkamo vektoriaus.

Terminu "Tinkamas vektorius" įvardinamas DNR darinys (konstrukcija), savo sudėtyje turintis struktūrinį geną, koduojantį norimą baltymą arba polipeptidą. Struktūrinis genas sujungiamas teisingai orientuojant su kontroliniais rajonais, tokiais kaip promotorinė seka, seka, formuojanti ribosomų surišimo sritį ir sekos, kontroliuojančios struktūrinio geno transliacijos ir transkripcijos terminaciją, t.y. su tokiais kontroliuojančiais rajonais, kurie funkcionuoja recipientinėje ląstelėje.

Kuomet ląstelė-recipientė pasižymi per žemu transformacijos ir integracijos dažniu, kaip tai būna, pvz., pramoninių Bacillus kamienų atveju, tam, kad būtų išspręstas tiesioginės įterpimo atrankos klausimas, nenaudojant tarpinio ląstelių, turinčių plazmidės, išskyrimo, reikia į vektorių papildomai įjungti replikacijos pradmens vieneta, sąlygojanti autonominę replikaciją ląstelėje-recipientėje.

Tuo atveju, kai genas gaunamas iš donorinės ląstelės, turinčios transkripcijos ir transliacijos, iniciacijos ir terminacijos reguliacinius signalus, kuriuos atpažįsta recipientiniai prokariotinių ląstelių kamienai, patogiu išsaugoti struktūrinio geno pradines reguliacines sekas. Be to, transkripcijos reguliacijos gali sąlygoti konstitucinę arba indukuojamą ekspresiją ir todėl, esant atitinkamai situacijai, recipientą galima kultivuoti iki didelio tankio, kol bus pasiektas tikslinių struktūrinių genų aukštas ekspresijos lygis.

Tuo atveju, kai struktūriniai genai gauti iš šaltinio, kurio reguliacinių signalų ląstelė-recipientė neatpažįsta, reikia turėti reguliacinius signalus, kuriuos atpažįsta recipientinė ląstelė. Struktūrinis genas turi būti įterptas tarp iniciacijos ir terminacijos reguliacinių signalų. Kartais egzogeninį struktūrinį geną, turintį nuosavą stopkodoną (kodonus), galima įterpti skaitymo rėmelyje po išsaugojusio savo reguliacinius signalus endogeninio struktūrinio geno N-galinių kodonų.

Pageidautina, kad ekspresijos produktas būtų sekretuojamas. Tai nesudėtinga realizuoti tuo atveju, kai ekspresijos produktas išsiskiria natūralia eiga ir recipientinė ląstelė atpažįsta lyderinius ir procesingo (brendimo) signalus. Tačiau tuo atveju, kai produktas neišskiriamas todėl, kad ląstelė-recipientė neatpažįsta sekrecijos lyderinių signalų ir/arba procesingo signalo (signalų), arba šie signalai nepakankamai veiklūs recipientėje, tuomet reikia išskirti arba susintetinti DNR sekas, koduojančias ląstelės-recipientės sekrecijos lyderinius ir polipeptido procesingo signalus ir prijungti jas taisyklingame skaitymo rėmelyje prie struktūrinio geno 5' galo.

Papildomai į vektorių galima įjungti markerinį geną, suteikiantį atsparumą antibiotikui, kuriam ląstelė recipientė yra jautri. Naudojant vektorių chromosominei integracijai, markerinis genas privalo atitikti išgyvenamumo atrankos galimybės reikalavimus, nežiūrint to, kad recipientėje bus tik viena ar keletas markerinio geno kopijų. Markeriniu genu laikomas struktūrinis genas, galintis ekspresuotis ląstelėje-recipientėje ir sąlygojantis pastarosios išgyvenamumą selekcijos sąlygomis. Tai gali būti fototrofiškumo suteikimas aukstotrofinei recipientei, atspariai biocidams arba virusams. Fototrofiškumo suteikimui gali būti panaudoti

įvairūs genai, tokie kaip lui, his, trp ir pan. Markeriais gali tarnauti atsparumas sunkiesiems metalams, imunitetas ir pan. Įvairias DNR sekas galima gauti iš įvairių DNR šaltinių, sujungti jas kartu į vektorių, turintį vieną ar daugiau patogų, pageidautina, unikalių restrikcijos saitą. Tai leidžia į šiuos saitus įterpti arba pakeisti struktūrinius genus, arba juos įterpti į paprastų fragmentų vietą, tuo būdu konstruojant plazmidinį darinį.

Plazmidę su replikacijos pradmens vienetu, turinčiu mutaciją, sąlygojančią šio geno veiklos recipientinėje ląstelėje priklausomybę nuo temperatūros, galima panaudoti chromosominio įterpimo atrankai (Ehrlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 1433).

Sukonstruotą plazmidinį darinį galima klonuoti tam tikslui panaudojant tinkamą klonavimo šeimininką. Galima panaudoti bet kokią šeimininką, kuris patogus, lengvai transformuojasi, leidžia plazmidiniui dariniui replikuotis. Po to pastarąjį darinį galima pernešti į ląstelę-recipientę. Yra daug kamienų, pasižyminčių aukštu transformacijos efektyvumu, auktrofiškumu ir/arba jautrumu antibiotikui. Kuomet ląstele-recipiente parenkamas Bacillus pramoninis kamienas, jis turi daug privalumų, tame tarpe ir klonuojant plazmidinį darinį. Jis leidžia panaudoti vieną replikacinę sistemą, o taip pat vieną ir tą patį markerį išgyvenamumo atrankai tiek klonavimo šeimininke, tiek ir recipientiniame kamienne (Europos patentas EP-A-134048).

Plazmidinį darinį galima įterpti į klonavimo šeimininką, panaudojant patogius būdus, tokius kaip: transformacija, DNR kalcio precipitacija, konjugacija ir pan. Po to klonavimo šeimininką galima išauginti tinkamoje maitinimo terpėje selekcijos sąlygomis, leidžiančiomis atrinkti šeimininką, turintį plazmidinį darinį.

Auksotrofiniams šeimininkams naudojama maitinimo terpė, stokojanti būtinos maitinimo medžiagos. Tuo tarpu biocidiniams atsparumui, pvz., atsparumui antibiotikams, patikrinti į maitinimo terpę pridedami biocido (biocidų) citotoksiniai kiekiai.

Galima naudoti įvairias ląsteles-recipientes, tokias kaip E. coli, Bacillus, ypač Bacillus subtilis, Pseudomonas ir Streptomyces kamienus. Pasirenkant ląstelę-recipientę atsižvelgiama į įvairius faktorius, tame tarpe ir į tokius, kurie gali turėti įtakos amplifikuoto geno ekspresijai ir norimo produkto gamybai. Geriausia panaudoti ląstelę-recipientę, kurioje galimas reguliacinių signalų atpažinimas, sekrecijos palengvinimas, norimo produkto degradacijos sumažinimas ir t.t. Tinkamiausia recipientinė ląstelė, kuri jau produkuoja norimą polipeptidą ir gali būti arba laukinio tipo, arba mutantinio tipo organizmas. Recipientė taip pat gali būti organizmo, produkuojančio norimą polipeptidą, mutantas, kuris liovėsi produkavęs. Kada norimu polipeptidu yra proteazė ar amilazė, tinkamiausi kamienai yra atitinkamai Bacillus novo species PB92 ir T5 Bacillus licheniformis, o taip pat šių kamienų mutantai ir variantai.

Be to, dar galima panaudoti ir pramoninius kamienus, pasižyminčius norimais privalumais. Kamienų, kuriuos galima panaudoti pavyzdžiais yra kamienai, naudojami pramoninei fermentų gamybai, tokie kaip B. licheniformis, B. amyloliquefaciens ir bazofilinės bacilos. Pramoniniai kamienai atrenkami iš organizmų, kuriuos galima išskirti iš dirvos arba gauti iš bankų ar kitų šaltinių, arba gaunami modifikuojant turimus kamienus. Pramoniniai kamienai labai našūs ir stabilūs. Dar daugiau, šie kamienai atsparūs faginei infekcijai ir genetiniams mainams, kuriems priklauso ir DNR įterpimas, panaudojant transformacijos būdus. Tinkami pramoniniai

kamienai yra taip pat fototrofiški tam, kad nereiktų i maitinimo terpę papildomas brangias aminorūgštis.

5 Kiti pramoninių kamienų ypatumai yra jų aukštas produktyvumas, išsilaikantis iki fermentacijos, kuri gali tęstis net savaitę, pabaigos; stabili ląstelių koncentracija iki bulijono išsekimo ir specifinio sekretuojamo baltymo aukštas produkcijos lygis (įprastas ne mažiau 5 g/l - 0.5 % (masė/tūris).

10

Galima gauti transformantus, turinčius arba tandemiškai išdėstytus genus, arba išsklaidytus išilgai chromosomos. Paprastai galima atrinkti transformantus, turinčius išsklaidytus genus tam tikslui išskiriant iš abiejų tipų transformantų mišinio chromosominę DNR iš kiekvieno transformanto, po to analizuojant šią DNR ir nustatant genų lokalizaciją, pvz., Southern, J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-517, metodu ar koku kitu būdu.

20 Vengiant tandeminio įterpimo, transformantus su išsklaidytais genais galima gauti panaudojant DNR linijines konstrukcijas, turinčias DNR seką, kurią reikia amplifikuoti, markerinį geną ir seką-taikinį rekombinacijai dvigubos reciprokinės rekombinacijos būdu
25 kaip tai parodyta Fig. 1B ir 2B.

Dar daugiau, transformantus su išsklaidytais genais galima gauti panaudojant netaisyklingą rekombinaciją, pavaizduotą Fig. 2A. Jos metu galima išvengti tandeminių transformantų, panaudojant atranką ir markerinio geno (pvz., koduojančio atsparumą antibiotikui) diferencinę ekspresiją, kuomet kamienų su netandeminiu ir tandeminiu geno įterpimu jautrumas antibiotikui skirtingas. Dažniausiai įterptų endogeninių DNR sekų ilgis -
30
35 mažiau 10.000 bazių porų.

Be to, vengiant tandeminės duplikacijos transformantus su išsklaidytais genais galima gauti protoplastus, gautus iš homologinio donorinio kamieno, turinčio DNR konstrukciją, sudarytą iš struktūrinio geno ir markerinio geno, kurioje, palyginus su akceptoriniu kamieniu, struktūrinis genas yra kitoje chromosomos vietoje.

Recipientinių ląstelių transformacijai geriausiai panaudoti protoplastus, paruoštus iš recipientinio kamieno. Protoplastai ruošiami iš ląstelių įprastiniais būdais, pvz., paveikiant lizocimu arba zimoliaze. Po to protoplastai atsargiai suspenduojami terpėje, kurios osmotiškumas tinkamas protoplastų išsilaikymui. Protoplastų iš Bacillus pramoninių kamienų paruošimo būdai aprašyti EP-A-0134048, kuris čia pateikiamas kaip literatūros šaltinis. Kuomet recipientiniu kamieniu parenkamas bazofilinis Bacillus kamienas, protoplastai gali būti paruošti esant šarminiam pH, geriau 8.0. Šis būdas aprašytas Europos patente Nr. EP-A-87200358.7.

Ląstelė recipientė transformuojama suliejant plazmidinį darinį arba klonavimo šeimininko protoplastą su ląstelės-recepienės protoplastu tam tikslui panaudojant tinkamą suliejimo reagentą. Galima naudoti bet kuri pakankamai aktyvų reagentą. Paprastai, polietilenglikolis sąlygoja pakankamai efektyvų suliejimą: Po trumpo laikotarpio reakcijos mišinys pakeičiamas tinkama maitinimo terpe. Ląstelės regeneruoja selektyvioje terpėje išsėjus į lėkšteles su agaru.

Transformantai, gauti suliejus ląstelę-recepienę su tinkama DNR konstrukcija, gali turėti šią visą konstrukciją arba jos dalį kaip sritį, įterptą į chromosomą. Jei DNR konstrukcija turi replikacijos pradmens vietą, funkcionuojanti recipientėje, tuomet DNR konstrukcija ląstelėje bus laisvos vektorinės molekulės pavidalu.

Transformantų, turinčių DNR konstrukciją, įterptą į chromosomą, selekcijos būdas grindžiamas plazmidės, turinčios temperatūrai jautrų replikacijos pradžios vienetą, panaudojimu. Transformantai auginami selektyvioje terpėje optimalioje temperatūroje, po to temperatūra pakeičiama į neoptimalią. Kolonijos, ekspresuojančios markerinį geną neoptimalioje temperatūroje išskiriamos ir auginamos selektyvioje terpėje optimalioje temperatūroje. Plazmidės nebuvimas gali būti patikrintas, pvz., suminės DNR išskyrimu iš kolonijų ir jos elektroforeze agarose gelyje arba transformantų nesugebėjimu transformuoti kompetentines ląsteles. Įsiterpimo į chromosomą tipas gali būti nustatytas chromosominės DNR analize, aprašyta Southern, J. Mol. Biol. 98, (1975) 503-517 arba kitais žinomais būdais.

Kuomet transformantai, turintys papildomas tandemiškai išdėstytas markerinio geno kopijas, palyginus su transformantais, turinčiais išsklaidytą recipientės genome markerinį geną, pasižymi diferenciniu jautrumu selektyviam agentui, tada transformantus galima auginti terpėje su selektyviniu agentu, tam kad būtų atrinkti transformantai su netandeminiais intarpais.

Transformantus su išsklaidytai įterptomis norimomis DNR sekomis galima gauti ir kitu būdu, panaudojant protoplastus, paruoštus iš homologinių donorinių ląstelių, turinčių nors vieną norimos DNR sekos kopiją, esančią kitoje negu recipientinės ląstelės chromosomos vietoje.

Homologinė donorinė ląstelė gali būti paruošta, transformuojant ląstelę, neturinčią norimo struktūrinio geno. Tam tikslui panaudojamas vektorius turintis norimą struktūrinį geną. DNR seka į donorinės ląstelės chromosomą gali būti įterpta lengvesniu būdu - panaudojant plazmidę, turinčią temperatūrai jautrų replikacijos pradžios vienetą ir po to auginant transformantą selekcijos

sąlygomis iš pradžių optimalioje temperatūroje, o vėliau neoptimalioje temperatūroje kaip tai aprašyta aukščiau. Kolonijos, ekspresuojančios markerinį geną, išskiriamos.

5

Po to, kai įsitikinama, kad nėra plazmidinės DNR, galim išskirti chromosominę DNR ir ištirti ją Southern metodu (žr. aukščiau) hibridizuojant su zonu, pažymėtu, pvz., ³²P arba biotinilintu nukleotidu. Zonu gali būti cDNR, koduojanti norimą polipeptidą, arba jos fragmentai, o taip pat ir DNR konstrukcija arba jos fragmentai, turintys savo sudėtyje norimą DNR seką, pvz., vektorius. Transformantai, turintys norimą geną kitoje vietoje, palyginus su genu, esančiu donoriniame kamienne, gali būti po to panaudoti kaip homologinė donorinė ląstelė. Recipientiniu kamieniu geriau parinkti tą kamieną, kuris naudojamas kaip norimos DNR sekos šaltinis, arba tą kamieną, kuriame norima DNR seka yra kitoje chromosomos vietoje, negu transformuotos donorinės ląstelės.

20

Siekiant palengvinti atranką, donorinė ląstelė užmušama citotoksiniu agentu prieš ar protoplasto susidarymo metu. Donorinės ląstelės užmušimui galima naudoti įvairius agentus, tame tarpe ir antibiotikus. Pastebėta, kad patogeniu efektyviu agentu, neveikiančiu būsimo suliejimo, yra jodoacetamidas. Naudojant klonavimo šeimininko užmuštus protoplastus, santykis užmuštų protoplastų su akceptoriniu recipiento kamieniu turi būti ne mažiau 1:1 arba galima naudoti užmuštų protoplastų perteklių.

30

Suliejus užmuštos donorinės ląstelės protoplastą su recipientinės ląstelės protoplastu, transformantai gali būti atrinkti panaudojant markerinį geną. Po to DNR galima išskirti ir ištirti kaip tai aprašyta aukščiau. Identifikuojami transformantai, kurių genome yra įsiterpusios daugiau kaip viena norimo geno kopijos, at-

35

skirtos tarpusavyje endogeninėmis chromosominėmis sekomis.

Transformantai su išsklaidytais genais skринinguojami
5 ieškant variantų, pažyminčių norimo polipeptido padidinta ekspresija. Tam tikslui naudojami įvairūs būdai, pvz., naudojami fermentai. Tais atvejais, kai nėra fermentų ar nėra tinkamos ieškojimo sistemos, klonų skринingui galima naudoti bioanalizę, antikūnus, DNR ar RNR
10 hibridizaciją, siekiant identifikuoti plazmidinę konstrukciją ir norimo struktūrinio geno ekspresiją.

Be to, recipientinė ląstelė, turinti į chromosomą įterptą plazmidinę konstrukciją arba jos fragmentus, auginama
15 maitinimo terpėje tinkamose fermentacijai sąlygose. Fermentacija tęsiasi, kol išsenka bulijonas. Jeigu produktas sekretuojamas, tai jis išskiriamas iš bulijono, panaudojant atitinkamą būdą, pvz., ekstrahavimą, chromatografiją, elektroforezę ir pan. Jeigu produktas
20 lieka citoplazmoje, tuomet ląsteles galima surinkti centrifuguojant ar filtruojant ir t.t., jas lizuoti mechanškai arba detergentu, lizocimu ar kitokiu būdu ir išskirti produktą kaip tai aprašyta aukščiau. Naudojant
25 šiame išradime aprašytą būdą, galima stabiliai įterpti ne mažiau dviejų DNR sekų kopijų, pasiekiant geno amplifikaciją.

Sekantys pavyzdžiai pateikiami kaip iliustracija, kuri
neišsemia visų galimybių.

EKSPERIMENTINĖ DALIS

1 pavyzdys

- 5 **Genominės DNR bibliotekos iš bazofilinio *Bacillus novo* specijos PB92 kamieno paruošimas ir serininės proteazės geno išskyrimas**

10 Chromosominė DNR, išskirta iš *Bacillus novo* sp. PB92 (saugoma Olandijoje, Delfte, Technikos Universiteto mikrobiologijos laboratorijoje, Nr. OP-60. žr. patentą JAV Nr. Pl 30.602) pagal būdą, aprašytą Saito-Miuva, Biochim. Biophys. Acta, 72 (1963) 619-632, po to paveikta restrikciniiais fermentais Sau 3A ir liguota Bam
15 111 saite į plazmidę puB110 (Gryczan ir kt., J. Bacteriol. 134 (1978) 318-329). puB110 plazmidinė DNR paruošta kaip aprašyta Birnboim ir Boly, Nucl. Acids Res., 7, (1973) 1513-1523.

20 Liguotas mišinys transformuojamas į *B. subtilis* 1A40 (Bacilų saugojimo Genetinis Centras) pagal metodą, aprašytą Spizizen ir kt., J. Bacteriol., 81 (1961) 741-746, panaudojant 0,6-1 µg DNR/1ml kompetentinių ląstelių.

25 Ląstelės iš transformuojančio mišinio išsėjimas į minimalias lėkšteles su 2,8 % KH_2PO_4 ; 1,2 % KH_2PO_4 ; 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 % tris-Na-citrato- $2\text{H}_2\text{O}$; 0,04 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,00005 % $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,4 % L-gliutamininės rūgšties;
30 0,5 % gliukozės; 0,02 % kazamininių rūgščių; 50 µ/ml metionino; 20 µg/ml lizino; 20 µg/ml neomicino; 0,4 % kazeino ir 1,5 % agarų. Po lėkštelių ir inkubacijos per naktį 37°C temperatūroje viena iš 50.000 kolonijų, atsparių neomicinui, pasižymėjo padidinta proteazės produkcija. Tai buvo nustatyta pagal padidėjusią precipitacijos lauką, atsiradusią aplink koloniją ant agarų ir kazeino skaldymo produktų. Plazmidinė DNR išskirta
35

iš šios kolonijos pagal metodą, aprašytą Birnboim ir Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513-1523) ir pažymėta pM58.

5 2 pavyzdys

Serininės proteazės geno PB92 ekspresija

10 Bacillus subtilis 1A40, turinti pM58, išauginta minimalioje terpėje (Spizizen ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44 (1958) 1072-1078), į kurią pridėta 0,02 % kazeininių rūgščių; 50 µg/ml lizino ir 20 µg/ml neomicino. Po 24 val. kultūra nucentrifuguojama ir patikrinamas supernatanto proteazinis aktyvumas panaudojant kaip
15 substratą dimetilkazeiną (Lin ir kt., J. Biol. Chem. 244 (1969) 789-793). Kultūra B. subtilis 1A40, turinti plazmidę puB110, panaudota kaip kontrolė, kurios proteazinis aktyvumas sudarė mažiau kaip 1/60 kultūros, transformuotos pM58, proteazinio aktyvumo. Proteazinį
20 aktyvumą slopino 1 mM fenilsulfonilfluorido (PMSF), bet ne 20 mM EDTA.

Aukščiau paminėti supernatantai išanalizuoti baltyminiame gelyje pagal būdą, aprašytą Laemmli, Nature 227
25 (1970) 680. Mėginiai šiai analizei paruošiami supernatantą paveikiant 5 % trichloracto rūgštimi (TChA). Po to centrifuguojama, precipituoto baltymo nuosėdos 2 kartus plaunamos acetonu, po to ištirpinamos 40 µl bufferio (0,5 M Tris·HCl, pH 7,5; 10 % (tūrio) 2-merkaptoetanolio; 50 % (tūrio) glicerino ir 0,05 % bromfenolio mėlynojo) virinant 10 min. Kultūrų supernatanto mėginiai tiriami elektroforetiškai. Ištirti trys skirtingi B. subtilis 1A40 kamienai: kamienai, turintys puB110 arba pM58, kamienas be plazmidės ir Bacillus
30 PB92 proteazė kaip kontrolė. Po elektroforezės geliai dažomi Kumasi briliantiniu mėliu ir atplaunami. B. subtilis kamieno 1A40, turinčio pM58, mėginys turėjo 31

kDa baltymą, kuris migravo kartu su Bacillus PB92 proteaze. Šis baltymas neaptiktas kontroliniame - kamieno B. subtilis 1A40, turinčio puB110, takelyje.

5 Visos serininės proteazės turi vienodą molekulinę masę. Todėl klonuota Bacillus PB92 serininė proteazė diferencijuojama nuo visų kitų žinomų serininių proteazių (B. subtilis subtilizino, Carlsberg subtilizino) transformuojant pM58 ir puB110 į beproteazinį B. subtilis
 10 kamieną DB104 (R. Doi, J. Bacteriol. 160 (1984) 442-444). Po to analizuojama produkujama ekstraląstelinė proteazė. Gauti transformantai auginami minimalioje terpėje (Spizizen ir kt., žr. aukščiau), turinčioje 0,02 % kazamininių rūgščių, 50 µg/ml histidino ir
 15 20 µg/ml neomicino. Po 24 val. paimami mėginiai, centrifuguojami ir be papildomo paruošimo analizuojami tam tikslui panaudojant histidino IMOPS gelius, turinčius 75 mM KOH; 40 mM histidino; 100 mM MOPS)3-)N-morfolino)-propansulfurūgštis), pH 7,5 ir 5% poliakrilamido.
 20 Elektroforezės buferis turėjo 40 mM histidino, 100 mM MOPS, pH 6,6. Mėginiai judėjo katodo kryptimi. Proteazės juostos aptinkamos profesionalių juostelių AgFa Pan 100 pagalba (Zuidweg ir kt., Biotechnol. and Bioengin. 14 (1972) 685-714). Šie rezultatai parodyti
 25 Fig. 3. Iš jų matyti kad PM58 turi geną, koduojantį Bacillus PB92 proteazę.

3 pavyzdys

30 **Bacillus PB92 serininės proteazės geno nukleotidinių sekų nustatymas**

pM58 Bal I - Hpa I fragmento seka nustatyta panaudojant būdą, aprašytą Sanger, Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 77
 35 (1977) 6463. pM58 restrikciniai fragmentai (žr. 4 pav.) klonuoti fago M13 vektoriuose mp10, mp11 ir mp18 (Meshing ir kt., Nucleic Acids Res., 9 (1981) 309-321).

Fragmentų pM558 įsiterpimas skrininguojamas pagal hibridizacijos rezultatus. Sekvenavus paruoštą dešimt nukleotidų, lokalizuotų gelyje lygiais tarpais, ir pakartotas sekvenavimas, patvirtinęs seką, parodytą Fig. 5.

5

4 pavyzdys

Plazmidės pMAX-4, turinčios serininės proteazės geną, konstravimas

10

Konstruojant plazmidę puCN (Fig. 6A) plazmidę puB110 paveikiama fermentais Tag 1 ir Pvu 11. Fragmentas, turintis atsparumo neomicinui geną, išvalytas panaudojant žemos lydymosi temperatūros agarozę ir po to jo galai paveikti Klenovo polimerazės fragmentu (Maniatis, Molekulinis klonavimas: A laboratory Manual Cold Spring Harbor, 1982). Plazmidę puC7 (Vilira ir kt. Gene 19 (1982) 259-268) linearizuota Sal 1 ir galai apdoroti kaip aprašyta aukščiau. Abu fragmentai liguoti Tu ligaze (Maniatis) ir transformuoti į E. coli IML 03. Atranka atlikta 2xTY lėkštelėse (1,6 % svoris/tūris Bakto triptono; 1 % svoris/tūris mielių ekstrakto; 0,5 % NaCl, 50 µg/ml ampicilino ir 10 µg/ml neomicino). Gauta plazmidė, pavadinta puCN710, paveikta restriktaze Bam H1. Plazmidė pE194 (Iordanescu, Plasmio (1978) 468-479) suskaldyta Bcl 1. Fragmentai liguoti T4 ligaze ir transformuoti į B. subtilis 1A40. Atranka atlikta minimaliose lėkštelėse, turinčiose 20 µg/ml neomicino (žr. Fig. 1). Gauta plazmidė pE194-neo (Fig. 6A) turėjo neomicino geną ir temperatūrai jautrų replikacijos pradmens vieneta.

30

Proteazės genas subklonuotas į įterpimo vektorių pE194-neo sekančiu būdu: pM58 (žr. Fig. 7) paveikiama fermentais Hpa1 ir Bcl 1 ir Bgl 11. Plazmidė pE194-neo paveikiama Hpa 1. Šie fragmentai liguojami T4 ligaze ir transformuojami į B. subtilis 1A40. Transformantai at-

35

renkami pagal atsparumo neomicinui ir proteazės produkcijos padidėjimo požymius. Apie tai sprendžiama iš precipitacijos arealo, kurį sudaro kazeino skaldymo produktai (žr. Fig. 1), dydžio. Gauta plazmidė puAX-4, kurios struktūra nustatyta restrikcine fermentų analize (žr. Fig.6B).

5 pavyzdys

10 **Bacillus PB92 pMAX-4 protoplasto transformacija**

Bacillus PB92 augintas per naktį 100 ml NBSG-X tirpale (Thorne etcel., J. Bacteriol. 91 (1966) 1012-1020). Kultūra buvo centrifuguojama 10 min esant 4.500 aps/min rotoriuje Sorvcell modelis CSA. protoplastai buvo paruošti inkubuojant bacilas 1 val. 37°C temperatūroje 10 ml šarminio tirpalo (ANM), turinčio 0,5 M sacharozės; 0,02 M MgCl₂ ir 0,02 M Tris-maleat, pH 8,0; steriliame vandenyje, į kurį buvo pridėta 0,4 mg/ml lizocimo. Protoplastai buvo nusodinti per 10 min esant 4.500 aps/min, resuspenduoti 5 ml ANM⁺ buferinio mišinio (ANM buferis, į kurį pridėta 3,5 % svoris/tūris Bakto Penassay bulijono ir 0,04 % svoris/tūris Merieux albumino), kurio pH 8,0, sumaišyti ir vėl nusodinti kaip aprašyta aukščiau. Po resuspendavimo 5,0 ml ANM, 0,5 ml šios protoplastų suspensijos buvo sumaišyta su 55 µg demineralizuoto vandens, turinčio 1 µg plazmidinės DNR ir inkubuota 2 min. su 30 % svoris/tūris polietilenglikolio 8.000, pH 8,0. Tris kartus praskiedus tirpalu ANM⁺ pH 8,0 ir centrifugavus, nuosėdos resuspenduotos mažame tūryje 1 ml ANM⁺ ir inkubuotos 2-3 val. Alikvotos po 100 ml buvo išsėtos naujai paruoštose regeneracinėse lėkštelėse su 0,55 M sukcinato-HCl pH 8,0; 1,55 % svoris/tūris agaro; 0,5 % svoris/tūris kazamininių rūgščių; 0,55 % svoris/tūris mielių ekstrakto; 0,031 M fosfatinio buferio pH 8,0; 0,5 % svoris/tūris gliukozės; 0,02 mg MgCl₂ ir 0,02 % svo-

ris/tūris Merieux albumino. Šiose lėkštelėse taip pat buvo 1000 µg/ml neomicino selekcijai. Po inkubacijos prie 37°C ne mažiau 72 val. kolonijos perneštos į lėkšteles su agaru, turinčiu širdies raumens ekstraktą ir 20 µg/ml neomicino.

6 pavyzdys

pMAX-4 įterpimas į *Bacillus kamieno* pB92 chromosomą

10

Transformantas *Bacillus* pB92, turintis plazmidę pMAX-ė, inkubuojamas Triptono sojos bulijone (TSB), turinčiame arba 1 µg/ml, arba 20 µg/ml neomicino, 24 val prie 37°C.

15

Po to po 2 ml ląstelių suspensijos atskiedžiama 100 ml TSB, turinčio atitinkamai 1 µg/ml arba 20 µg/ml neomicino, ir inkubuojama 24 val prie 50°C. Po 24 val. abiejų kultūrų mėginiai po 1 ml vėl atskiedžiami, kaip nurodyta aukščiau ir inkubuojami 24 val. prie 50°C vėl pridėjus atitinkamai 1 µg/ml arba 20 µg/ml neomicino. Pastaroji procedūra pakartojama dar vieną kartą. Tada ląstelių suspensijos atskiedžiamos 100 kartų ir išsėjamos į lėkšteles su agaru, turinčiu širdies raumens ekstraktą (H1-agaras) ir atitinkamai 1 µg/ml neomicino (kultūrų, augintų terpėje su 20 µg/ml neomicino mėginiams. Lėkštelės inkubuojamos 16 val prie 50°C. Rezistentiškos neomicinui kolonijos išskiriamos ir auginamos 10 ml TBS terpės, turinčios 1 µg/ml neomicino, 16 val prie 37°C. Iš šių kolonijų išskiriama suminė DNR (Holmes ir kt., Anal Biochem 114 (1981) 193-197). Plazmidės nebuvimas tikrinamas DNR elektroforeze agarozės gelyje. Plazmidinės DNR nebuvimas mėginiuose patvirtinamas transformuojant suminę DNR į *B. subtilis* 1A40. Nuspręsta, kad mėginiai, negalintys transformuoti *B. subtilis*, neturi plazmidės.

35

Tam, kad būtų nustatyta, kur ir koku būdu pMAX-4 įsiterpusi į chromosomą, išskiriama chromosominė DNR paveikiama Hind III ir analizuojama 0,5 % agarozės gelyje pernešant ant nitroceliuliozės (Southern, J. Md. Biol., 98 (1975) 503-517) ir hibridizuojant su 32P pažymėta po niktransliacijos pM58 (Maniatis, 1982). Šios analizės duomenys parodyti Fig. 7A.

Po selekcijos 1 µg/ml neomicinu proteazės genai buvo tandemiškai išsidėstę chromosomoje, o po Campbell-tipo homologinės rekombinacijos šie genai buvo atskirti kamieno PBT109 plazmidinėmis sekomis. Išskyrus 30 nepriklausomų integrantų, vėl buvo atlikta atranka terpėje su 1 µg/ml neomicino. Išskirtas vienas integrantas po netaisyklingos rekombinacijos (kamienas PBT122), turintis plazmidę pMAX-4, įsiterpusią atsitiktinėje chromosomos vietoje. Šis kamienas pažymėtas PBT108. Kamienų PBT109 ir 108 genetinė organizacija parodyta atitinkamai Fig. 7B ir 7C. Chromosominė analizė patvirtina, kad PBT122 ir PBT108 tarpai yra skirtingose chromosomos vietose.

7 pavyzdys

25 Kamienuose PBT108 ir PBT109 esančių dvigubų proteazės genų stabilumas

500 ml talpos kolbos su 100 ml gamybinės terpės be neomicino (turinčios: 1 % krakmolo, 4 % laktozės, 0,8 % K_2HPO_4 ; 0,5 % mielių ekstrakto; $2H_2O$; 0,55 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,07 % $CaCl_2$; 0,068 % $FeO_4 \cdot 7H_2O$ ir 1 ml/l skysčio prieš putojimą) pasėjama po 0,2 ml ląstelių suspensijos iš kamieno PBT108 arba PBT109 kultūrų, augintų per naktį 37°C temperatūroje. Inkubuojama 44 val. 37°C temperatūroje pastoviai aeruojant. Po to klonuojant patikrinamas kultūros atsparumas neomicinui ir jos proteazinis aktyvumas.

Kamienai PBT108 ir PBT109 patikrinti Eschweiler fermentatoriuose, užpildytuose aukščiau paminėta gamybine terpe, norint išsiaiškinti tūrio padidėjimo iki 1l efekta. Fermentacijos bandymų duomenys suvesti 1 lentelėje.

5

1 lentelė

Kamienas	Santykinė proteazės gamyba*	Atsparių neomicinui ląstelių % po fermentacijos
Kontrolė (PB92)	100 %	-
PBT108	120 %	100 %
PBT109	115-120 %	75-97 %

* Proteazės aktyvumas patikrintas naudojant dimetilka-
 10 zeiną kaip substratą (Lyn ir kt., J. Biol. Chem. 244
 (1969) 789-793.

Patikrinus kolonijas, gautas iš kamieno PBT109 po jo
 auginimo 2 dienas Eschweiler fermentatoriuje, rasta,
 15 kad 3-25 % šių kolonijų proteazės aktyvumas buvo kaip
 kamieno, turinčio tik vieną proteazės geną. Nustatyta,
 kad aukščiau paminėtos kolonijos yra neomicinui jaut-
 rios, kadangi homologinės rekombinacijos metu pMAX-4
 yra iškerpama. Tuo tarpu patikrinus kolonijas, gautas
 20 iš kamieno PBT108 po jo auginimo fermentatoriuje, ras-
 ta, kad visos šios ląstelės yra neomicinui atsparios.
 Parinkta šimtas neomicinui atsparių kolonijų atsitik-
 tiniam ir individualiam proteazinio aktyvumo testavi-
 mui, siekiant nustatyti, kiek proteazės genų - vieną ar
 25 du jos turės. Visos 100 individualiai testuotų kolonijų
 produkavo kamieno, turinčio du genus, lygyje. Tai rodo,
 kad du, atsitiktiniai įterpti į kamieną PBT108 pro-
 teazės genai stabiliai laikėsi naudotose fermentacijos
 sąlygose.

30

8 pavyzdys**Integracinio vektoriaus pElaTB konstravimas**

5 Plazmidė pB34, aprašyta EPA 0134048 paveikta restrik-
ciniais fermentais bcl1, Bgl1 ir Bgl11. Gautų restrik-
cijos fragmentų galai paveikiami klenovo polimeraze ir
po to liguojami į pEl94-neo Hpa1 saitą (žr. fig. 6).
10 Plazmidės pEl94-neo DNR išskirta kaip aprašyta birnboim
ir Doly (Nucl. Acids. Res. 7 (1979) 15513-1523).

Gautas mišinys transformuojamas į B. subtilis 1A40
pagal būdą, kuri aprašė Spizizen ir kt. (J. Bacteriol.
81 (1961) 741-746), panaudojant 0,55-1 µg DNR/1 ml kom-
15 petentinių ląstelių.

Po to ląstelės išsėjamos į minimalias lėkšteles, tu-
rinčias 2,8 % K_2HPO_4 ; 1,2 % KH_2PO_4 ; 0,4 % $(NH_4)_2SO_4$; 0,2 %
tris-Na-citrato*2H₂O; 0,04 % $MgSO_4$ *7H₂O; 0,00005 %
20 $MnSO_4$ *H₂O; 0,4 % gliutamininės rūgšties; 0,555 % gliu-
kozės; 0.02 % kazamininių rūgščių; 50 µg/ml lizino;
20 µg/ml neomicino; 0,4 % kazeino, 0,5 % krakmolo ir
1,5 % agaro.

25 Birnboim ir Doly aprašytu būdu iš kolonijų, produkuo-
jančių alfa-amilazę, išskirta DNR, paveikta restrikci-
niais fermentais ir analizuota iš vieno transformanto
išskirta plazmidė pElaTB (žr. Fig. 8).

30 9 pavyzdys**pElaTB panaudojimas alfa-amilazę neprodukuojančio ka-
mienio Bacillus licheniformis T9 transformacijai**

35 Kamienas Bacillus licheniformis T9 transformuotas būdu,
aprašytu EP-A-02553455, su nedidele pataisa - procedūra
atlikta (30°C, o ne 37°C temperatūroje). Transformantų

atranka atlikta minimaliose lėkštelėse, turinčiose 20 µg/ml neomicino. Visi transformantai produkavo amilazę. Birnboim ir Doly aprašytu būdu išskirta DNR, atlikta restrikcinė analizė, kuri parodė, kad visi transformantai turi pElaTB.

10 pavyzdys

pElaTB įterpimas į *B. licheniformis* T9 chromosomą

10

Bacillus licheniformis kamienas T9, turintis plazmidę pElaTB, išsėjamas į Triptono sojos bulijoną (TSB), su 20 µg/ml neomicino ir inkubuojama 16 val. 30°C temperatūroje. 5 ml ląstelių suspensijos atskiedžiama 100 ml aukščiau paminėtos terpės ir inkubuojama 50°C temperatūroje 24 val.

15

Ši procedūra pakartojama. Po to ląstelių suspensija atskiedžiama 100 kartų ir išsėjama į lėkšteles su agaru, į kurią įdėtas širdies raumens ekstraktas ir 10 µg/ml neomicino. Inkubuojama 40 val. 50°C temperatūroje, po to išskiriamos kolonijos, atsparios neomicinui, ir kultivuojamos 10 ml TSB terpės su 10 µg/ml neomicino 16 val. 30°C temperatūroje. Tada iš kultūrų išskirta seiminė DNR (Holmes ir kt., Anal. Biochem. 114 (1981) 192-197). DNR elektroforezės agarozės gelyje būdu nustatyta, kad ląstelės neturi plazmidžių. Tai patvirtino ir papildomi tyrimai bandant transformuoti *B. Subtilis* 1A40 į neomicinui atsparų kamieną.

25

30

Tam, kad būtų patikrinta, ar pElaTB yra įsiterpusi į genomą ir koku būdu iš transformantų išskiriama chromosominė DNR (Saito-Miura, Biochem. Biophys., Acta, 72 (1963) 619-632), paveikiama EcoRI, frakcionuojama 0,55 % agarozės gelyje, pernešama ant nitroceliuliozės (Southern, J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-517) ir hibridizuojama su 32P pažymėta nik-transliuota p-B33

35

(žr. EP-A-0134048). Šių tyrimų duomenys parodyti Fig. 9A. Duomenys rodo, kad yra įvykusi pElaTB netaisyklinga rekombinacija ir dėl to kamienas turi atskirą amilazės geną kitoje genomo vietoje, palyginus su pradinio amilaziniu kamieniu Bacillus licheniformis T5555. Gautas kamienas, turintis pElaTB, pažymėtas TB13.

11 pavyzdys

Kamieno T13F, turinčio du amilazės genus, atskirtus endogeninėmis chromosominėmis sekomis, konstravimas

Tam, kad būtų sukonstruotas kamienas, turintis du amilazės genus atskirtus endogeninėmis chromosominėmis sekomis, atliktas bandymas suliejant Bacillus licheniformis kamieną T5 (amilazinis kamienas, turintis pradinį amilazės geną, žr. EP-A-0134048. Prieš padarant protoplastus, kamienas TB13 užmušamas tam tikslui panaudojant jodacetamidą. Kamienas T5 (jautrus neomicinui) nebuvo užmuštas. Sulietų ląstelių atranka atliekama regeneracinėje lėkštelėje, turinčiose 10 µg/ml neomicino.

Tam, kad būtų patikrintos ir identifikuotos potencialios sulietos ląstelės, buvo išskirta chromosominė DNR, paveikta EcoR1, frakcionuota 0,5 agarozės gelyje, pernešta ant nitroceliuliozės filtrų (Southern, J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-517) ir hibridizuota su 32P pažymėta nik-transliuota pB33 (žr. EP-A-0134048). Šio tyrimo rezultatai parodyti Fig. 9B. Vienas iš gautų sulietų ląstelių klonų, T3F, turėjo 2 amilazės genus, atskirtus endogeninėmis sekomis.

12 pavyzdys

Kamienuose T390 ir T1F esančių dvigubų amilazės genų stabilumas

5 Kamieno T1F, turinčio du chromosominius amilazės genus, atskirtus esminėmis chromosominėmis sekomis, stabilumas palygintas su kamieno T390 stabilumu. Pastarasis ka-

10 mienas turi du chromosominius amilazės genus, lokalizuotus tandemine seka. Kamieno T390 gavimas aprašytas EP-A-134048 (17 psl. 1 lentelė), kur jis priskirtas B. licheniformis T5 (pGB33). Kamienai T13F ir T390 patikrinti fermentacijos sąlygomis. Tam tikslui 0,2 ml TSB kultūros, išaugintos per naktį 37°C temperatūroje,

15 pasėta į 500 ml talpos kolbas, turinčias 100 ml gamybinės terpės (žr. Fig. 7). Po sterilinimo pridedant NaOH pasiekiamas pH 6,9 (neomicinas nepridedamas). Po inkubacijos 6 dienas 40°C temperatūroje pastoviai aeruojant, testuojamas kultūros atsparumas neomicinui

20 ir amilazės aktyvumas. Bandymų duomenys suvesti 2 lentelėje.

2 lentelė

Kamienas	Santykinis amilazės aktyvumas	Atsparių neomicinui ląstelių % po fermentacijos*
T5	100 %	-
TB13	20 %	100 %
T390	200 %	88 %

25

* testuota virš 1000 kiekvieno kamieno kolonijų

Tam, kad būtų nustatyta, ar kamiene T13F prarastas vienas amilazės genas, išlaikant neomicino geną, išanalizuota 20 kolonijų, gautų po T13F auginimo fermentatoriuje. Išskirta chromosominė DNR iš 20 atsitiktinai

30

atrinktų kolonijų ir išanalizuota hibridizuojant kaip tai aprašyta aukščiau. Fig. 10 parodyti 9 tokių tyrimų duomenys. Visi ištirti kamienai turėjo du alfa amilazės genus jų chromosominėje DNR.

5

Priešingai genetiškai stabiliam T13F kamienui, kamienas T390 pasirodė besąs fermentacijos metu nestabilus - 12 % kolonijų buvo jautrios neomicinui. Patikrinus vieną koloniją aptiktas tik vienas alfa-amilazės genas (Fig. 10, 4 takelis). Tai rodo, kad išsklaidytai įsiterpę genai yra stabilesni fermentacijos sąlygomis negu tandemiškai įsiterpę genai.

10

Iš aukščiau pateiktų duomenų akivaizdu, kad galima gauti prokariotines ląsteles, kuriose stabili geno amplifikacija pasiekta atrenkant transformuotas ląsteles, kuriose įterpta ne mažiau dviejų struktūrinio geno kopijų. Geno įterpimas gali įvykti homologinės rekombinacijos arba netaisyklingos rekombinacijos būdu.

20

Šiame išradimo aprašyme paminėtos publikacijos pri-lygsta specialiai ir individualiai paminėtoms kaip nuo-roda.

25

Kadangi dabar išradimas pilnai aprašytas, tai įvairių pakeitimų ir modifikacijų galimybė, nenukrypstant nuo išradimo apibrėžties, apimties ir esmės, tėra tik tech-ninis reikalas.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė, turinti savo chromosomoje ne mažiau dviejų koduojančios norimą polipeptidą DNR sekos kopijų, b e s i s k i - r i a n t i tuo, kad kopijos atskirtos endogeninėmis DNR sekomis.
2. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė, turinti savo chromosomoje ne mažiau dviejų koduojančios norimą polipeptidą DNR sekos kopijų, b e s i s k i - r i a n t i tuo, kad minėtos kopijos atskirtos endogeninėmis DNR sekomis ląstelės-receptientės genome, o pati ląstelė-receptientė formuojama tokiu būdu:
 - ląstelės-receptientės, turinčios ne mažiau vienos aukščiau paminėtos sekos kopijos, įterptos į chromosomą kombinavimo transformacijos sąlygomis su a) DNR konstrukcija, turinčia ne mažiau vienos aukščiau paminėtos DNR sekos kopijos ir ne mažiau vieno markerinio geno bei temperatūrai jautrų replikacijos pradmens vieneta arba su b) donorine ląstele, turinčia aukščiau paminėtą DNR konstrukciją;
 - transformanto, kuriame minėta DNR konstrukcija įterpta į jo chromosomą, atrankos;
- transformuotų prokariotinių receptientinių ląstelių, turinčių ne mažiau dviejų aukščiau paminėtos DNR sekos kopijų, atskirtų endogeninėmis DNR sekomis, išskyrimo iš didelio aukščiau paminėto transformantų skaičiaus.
3. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 1 ir 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta prokariotinė ląstelė yra Bacillus kamienas.

4. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 1 ir 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos Bacillus kamienas yra bazofilinis Bacillus kamienas arba Bacillus licheniformis kamienas.

5

5. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 4 punktą b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas bazofilinis Bacillus kamienas yra Bacillus novo species PB92 arba jo mutantas, ar variantas.

10

6. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas receptientinis Bacillus licheniformis kamienas yra Bacillus licheniformis T5 kamienas arba jo mutantas, ar

15

7. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 1 ir 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas norimas polipeptidas yra fermentas.

20

8. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas fermentas yra proteolitinis fermentas arba amilolitinis fermentas.

25

9. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas proteolitinis fermentas yra serino proteazė.

30

10. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta serino proteazė turi tokią seką:

35

5 H2N-A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-H-N-R-G-I-T-G-S-G-V-K-V-A-V-I-I-D-T-G-I-S-T-
 H-P-I-I-N-I-R-G-G-A-S-P-G-E-P-S-T-Q-D-G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-I-A-A-I-I-N-N-S-I-
 G-V-I-G-V-A-P-N-A-E-I-Y-A-V-K-V-I-G-A-S-G-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-I-E-W-A-G-
 10 N-N-G-H-I-V-A-N-I-S-I-G-S-P-S-P-S-A-T-I-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-G-V-I-V-V-A-A-S-
 G-N-G-A-G-S-I-S-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-D-Q-N-N-N-R-A-S-P-S-Q-Y-G-A-G-
 I-I-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-G-S-T-Y-A-S-I-N-G-T-S-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-I-V-
 K-Q-K-N-P-S-W-S-N-V-Q-I-R-N-H-I-K-N-T-A-T-S-I-G-S-T-N-I-Y-G-S-G-I-V-N-A-E-A-
 A-T-R-COOH.

11. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal
 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas
 amilolitinis fermentas yra alfa-amilazė.

15 12. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal
 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad
Bacillus novo species PB92 arba jo mutanto, arba
 varianto genomas turi minėtą DNR seką.

20 13. Transformuota prokariotinė ląstelė-receptientė pagal
 1 ar 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad
Bacillus licheniformis T5 arba jo mutanto arba varianto
 genomas turi minėtą DNR seką.

25 14. Transformuotos prokariotinės ląstelės-receptientės,
 turinčios ne mažiau dviejų koduojančios norimą polipep-
 tidą DNR sekos kopijų, atskirtų endogeninėmis chromo-
 sominėmis sekomis minėtos receptientės genome paruošimo
 būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad

30 receptientinę ląstelę, turinčią ne mažiau vienos minėtos
 DNR sekos kopiją, įterptą į jos chromosomą kombinuoja
 transformacijos sąlygomis su a) DNR konstrukcija, tu-
 rinčia ne mažiau vienos minėtos DNR sekos kopiją ir ne
 35 mažiau vieno markerinio geno bei temperatūrai jautraus
 replikacijos pradmens vieneto, arba su b) donorine ląs-
 tele, turinčia minėtą DNR konstrukciją;

atrenka transformantą, kuriame minėta DNR konstrukcija įterpta į chromosomą, ir

5 išskiria transformuotas prokariotines recepietines ląsteles, turinčias ne mažiau dviejų minėtos DNR sekos kopijų, atskirtų endogeninėmis sekomis, iš didelio minėtų transformantų skaičiaus.

10 15. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atranka susideda iš:

minėto transformanto, turinčio DNR konstrukciją su markeriniu genu, auginimo terpėje su biocidu, atsparumą kuriam sąlygoja minėtas markerinis genas, ir

15 transformantų, neturinčių plazmidės, identifikacijos ir išskyrimo iš minėtų transformantų.

20 16. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atranka susideda iš:

minėto transformanto, turinčio markerinį geną ir temperatūrai jautrų replikacijos pradmens vieneta, auginimo terpėje su biocidu, permissyvinėje temperatūroje; ir

25 transformantų, neturinčių plazmidės, atrankos iš minėtų transformantų.

30 17. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas išskyrimas susideda iš:

35 chromosominės DNR iš minėtų transformantų išskyrimo; ir minėtos chromosominės DNR hibridizacijos su žymėtu zonu, turinčiu DNR konstrukciją arba jos fragmentą, ko pasekoje pagal aptiktą žymę atrenkamos minėtos transformuotos prokariotinės ląstelės.

18. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta recipientinė ląstelė gaunama būdu, susidedančiu iš:
- 5 prokariotinės ląstelės, neturinčios DNR sekos, koduojančios norimą minėtą polipeptidą, kombinavimo suliejimo sąlygomis su DNR konstrukcija;
- transformuotų ląstelių išskyrimo;
- 10 minėtų ląstelių auginimo nepermisyvioje temperatūroje; ir
- transformuotų ląstelių, kuriose minėta DNR konstrukcija
- 15 įterpta kitoje chromosomos vietoje negu minėtos recipientinės ląstelės, identifikavimo ir išskyrimo.
19. Būdas pagal bet kurį iš 14-18 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta prokariotinė ląstelė yra
- 20 Bacillus.
20. Būdas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas Bacillus yra bakteriologinis Bacillus kamienas arba Bacillus licheniformis kamienas.
- 25
21. Būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas bazofilinis Bacillus novo species PB92 ir minėtas Bacillus licheniformis kamienas yra Bacillus licheniformis T5 kamienas.
- 30
22. Būdas pagal bet kurį iš 14-21 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas norimas polipeptidas yra fermentas.
23. Būdas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas fermentas yra serino proteazė arba amilazė.
- 35

24. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta serino proteazė, turi ne mažiau 70 % nukleotidinės sekos homologijos su proteolitinį fermentą koduojančiu genu iš Bacillus novo species PB92.

5

25. Būdas pagal 23 ar 24 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėta serino proteazė turi sekančią aminorūgščių seką:

10

H2N-A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-H-N-R-G-I-T-G-S-G-V-K-V-A-V-I-D-T-G-I-S-T-
H-P-I-D-I-N-I-R-G-G-A-S-P-G-E-P-S-T-Q-D-G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-I-A-A-I-N-N-S-I-
G-V-I-G-V-A-P-N-A-F-I-Y-A-V-K-V-I-G-A-S-G-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-I-I-E-W-A-G-
N-N-G-H-H-V-A-N-I-S-I-G-S-P-S-P-S-A-T-L-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-G-V-I-V-V-A-A-S-
G-N-G-A-G-S-I-S-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-D-Q-N-N-N-R-A-S-P-S-Q-Y-G-A-G-
I-D-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-G-S-T-Y-A-S-I-N-G-T-S-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-L-V-
K-Q-K-N-P-S-W-S-N-V-Q-I-R-N-H-I-K-N-T-A-T-S-I-G-S-T-N-I-Y-G-S-G-I-V-N-A-E-A-
A-T-R-COOH.

15

20

26. Būdas pagal bet kurią iš 14-25 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad minėta DNR konstrukcija yra pMAX-4 arba pElaTB.

25

27. Būdas pagal bet kurią iš 14-26 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka įterpta ne- taisyklusios rekombinacijos būdu.

30

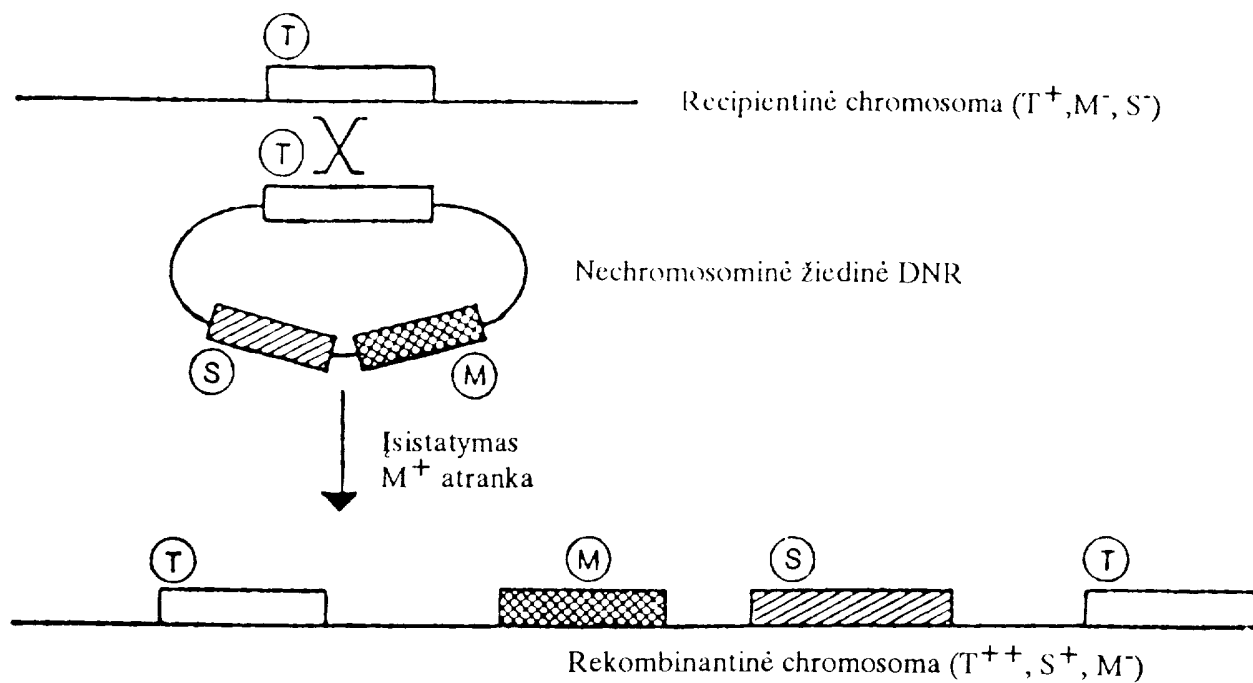
28. Būdas pagal bet kurią iš 14-26 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka įterpta homo- loginės rekombinacijos būdu.

35

29. Būdas pagal bet kurią iš 14-16 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad minėta DNR konstrukcija turi dar ir temperatūrai jautrų replikacijos pradmens vie- netą.

30. Būdas pagal 29 punkta, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad minēta temperatūrai jautri plazmidē yā plaz-
midēs pE194 darinys.

A. CAMPBELL Rekombinacijos tipas



B. Dviguba reciprokinė rekombinacija.

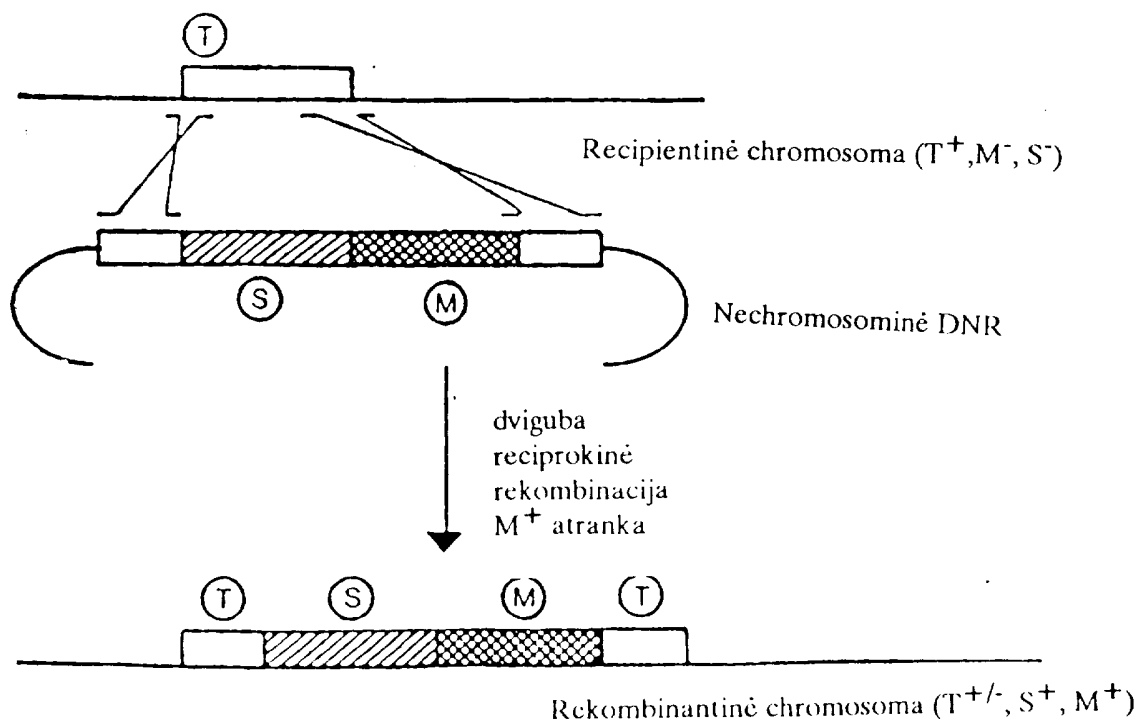
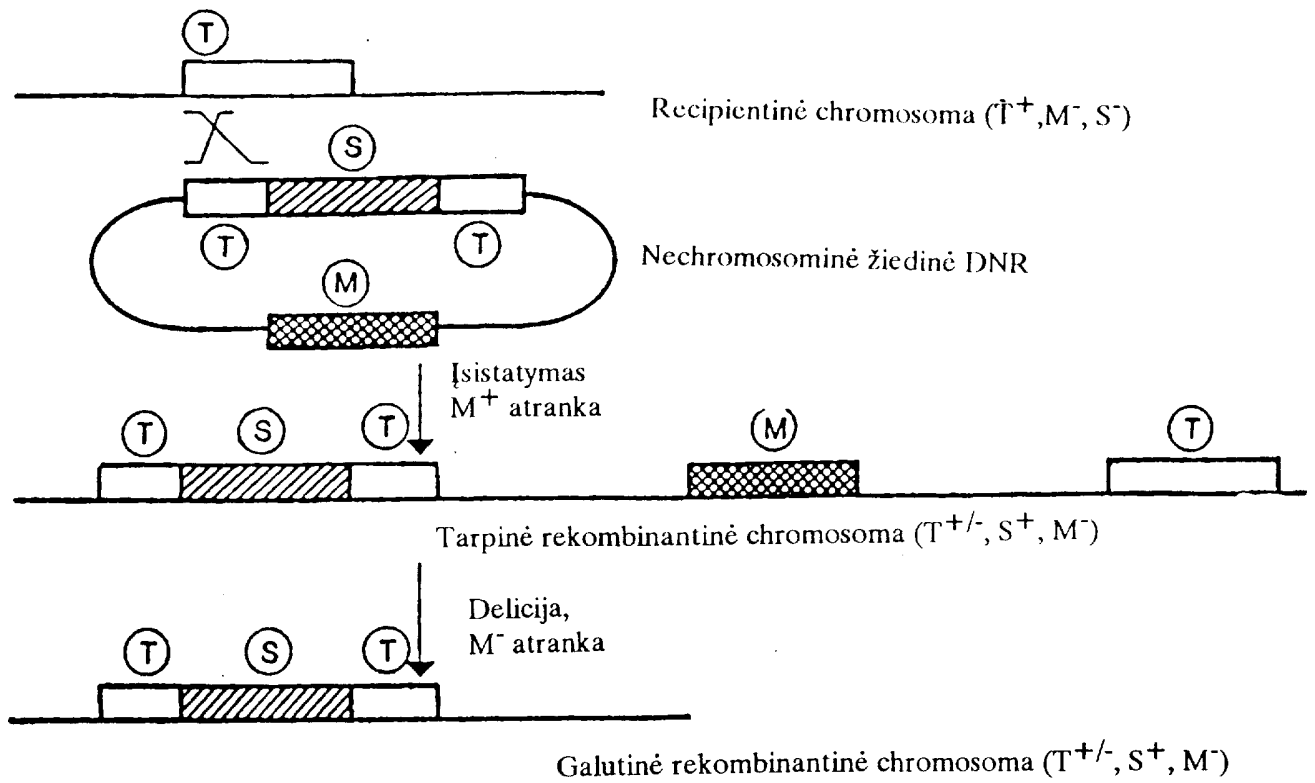


Fig. 1

C. Dvipakopio įsistatymo mechanizmas



D. Įsistatymas netaisyklingos rekombinacijos būdu

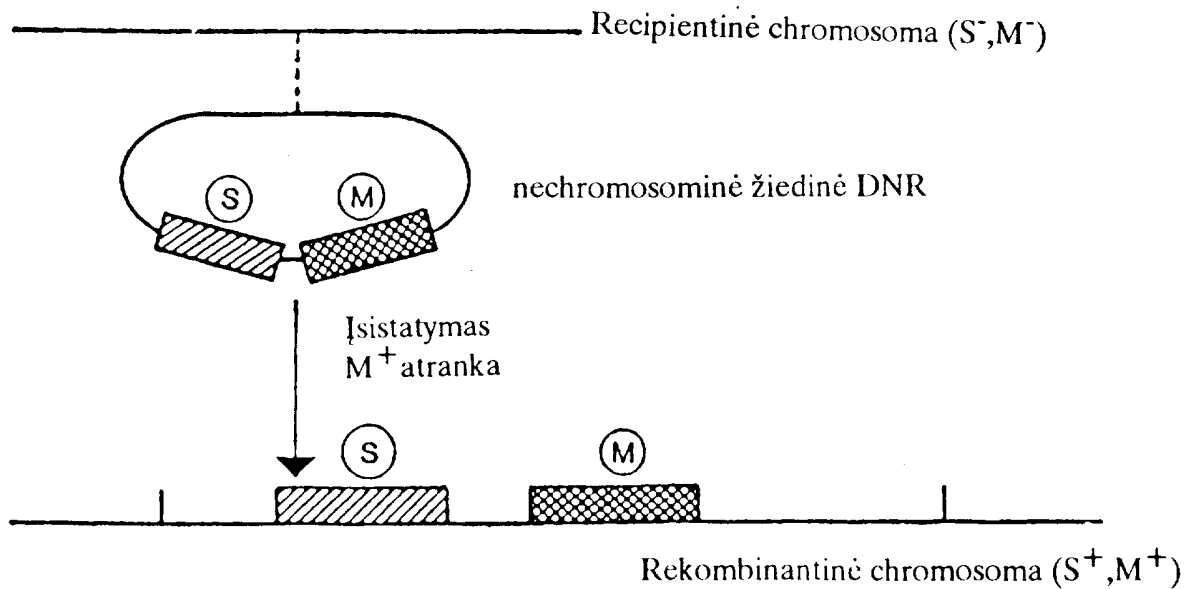


Fig.1 (tęsinys)

A. Išsklaidytas įsistatymas ir DNR sekų dauginimas panaudojant netaisyklingą rekombinaciją

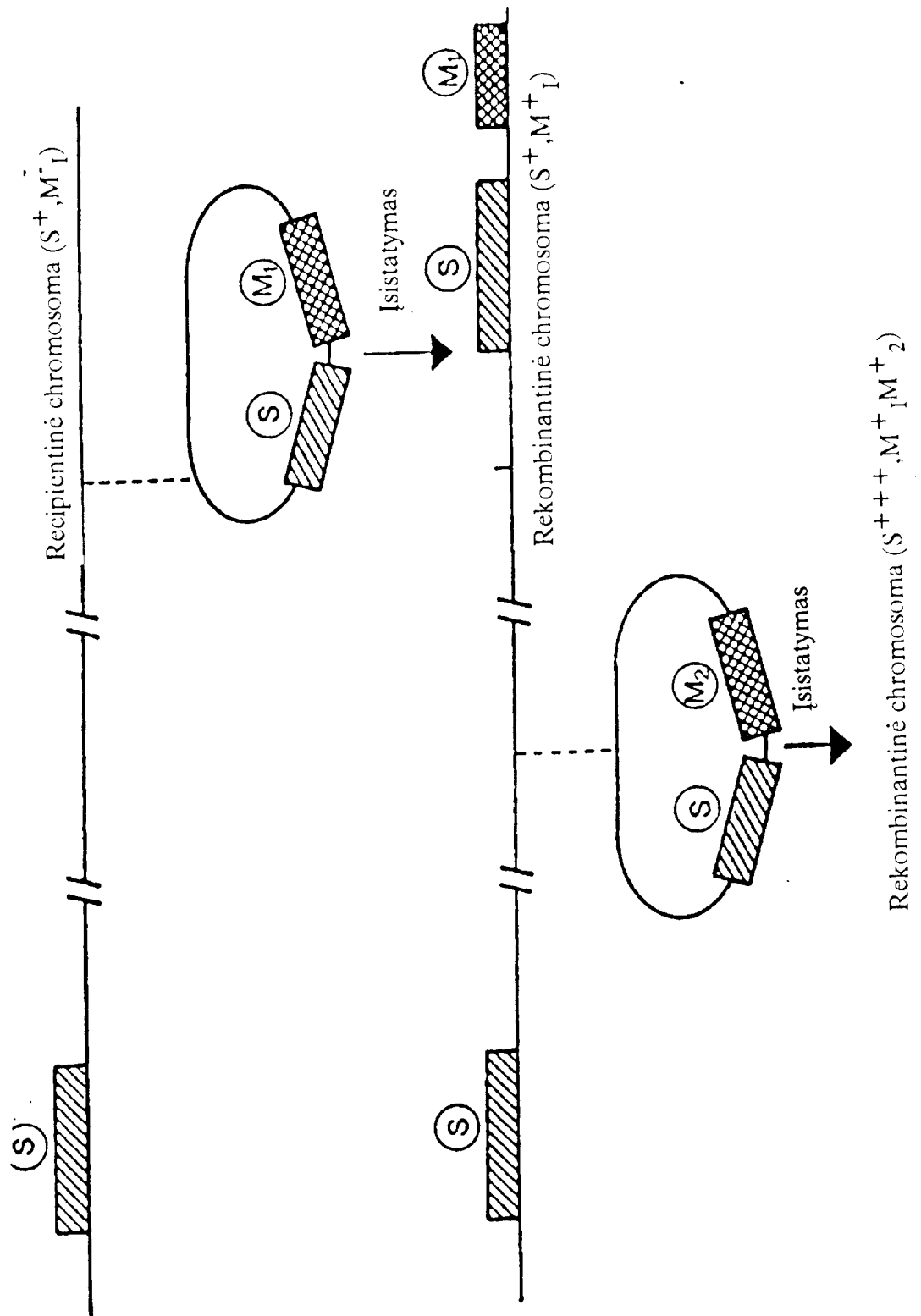


Fig.2

B. Išsklaidytas įsistatymas ir DNR sekų dauginimas, panaudojant homologinę rekombinaciją.

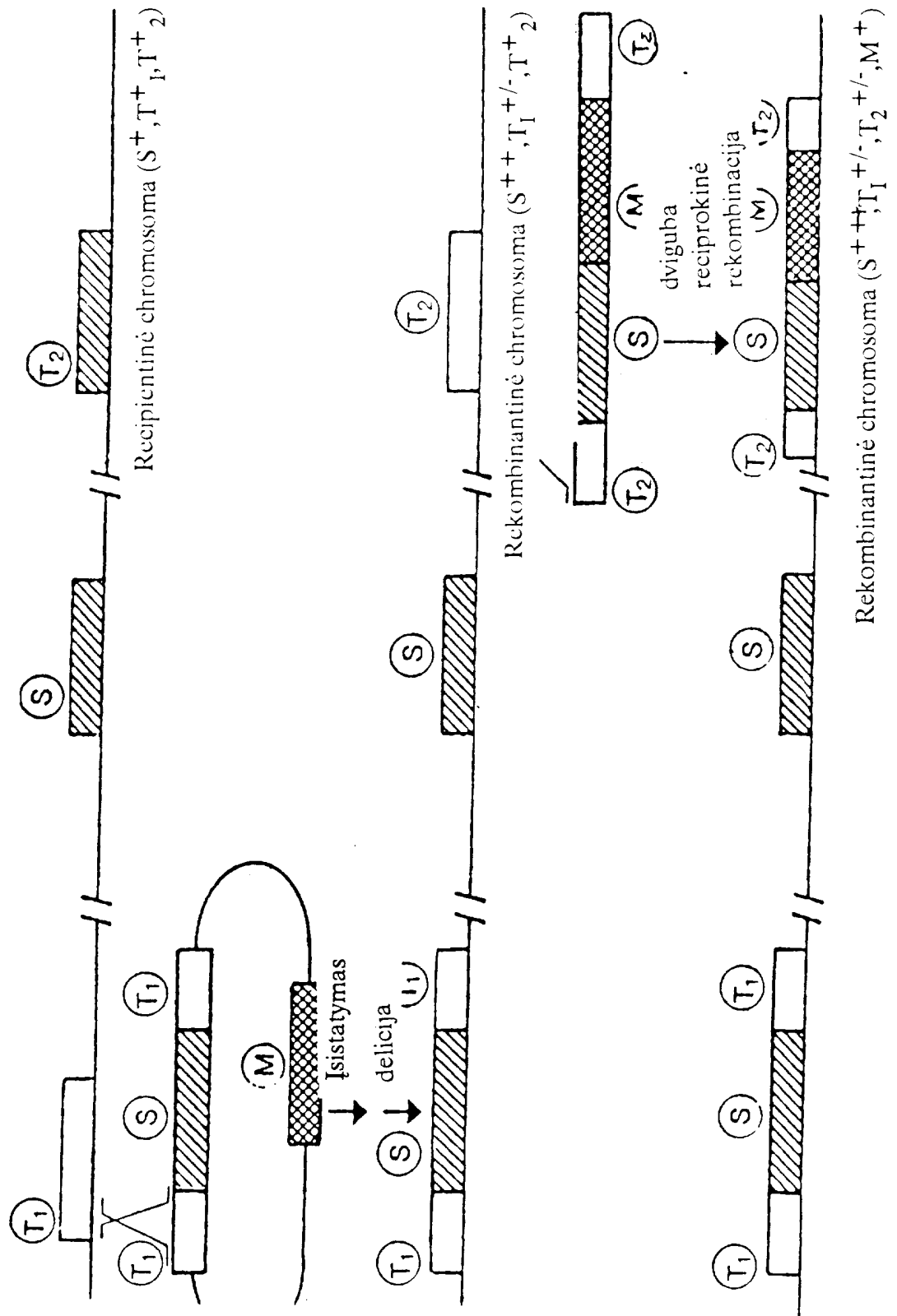


Fig.2 (tęsinys)

LT 4001 B

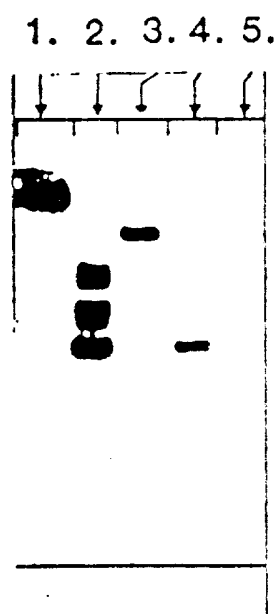


Fig.3

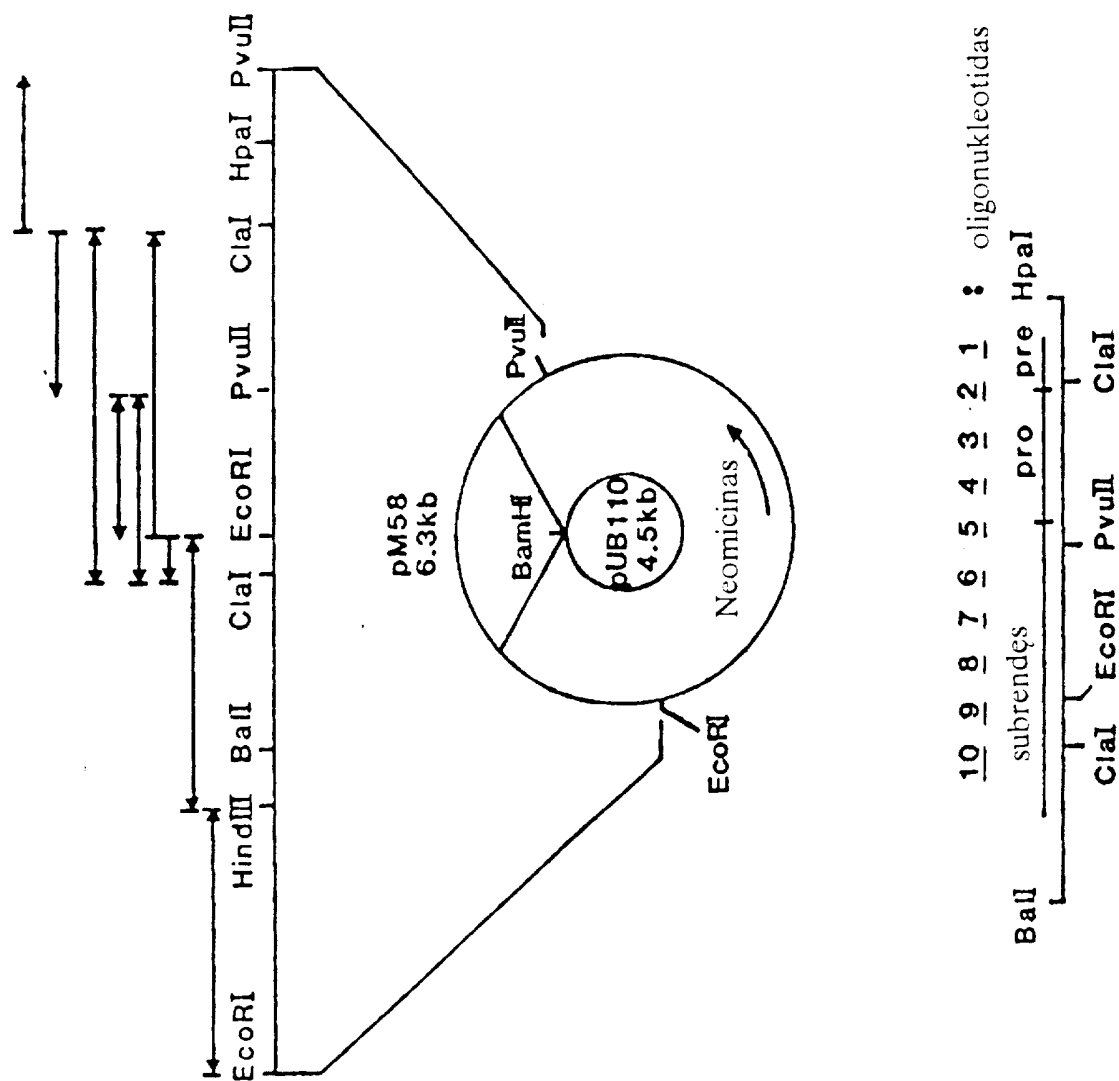


Fig.4

LT 4001 B

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 6ATTCTGTTAACTTAACTTAATTTGTTTCCCAATAGGCAATCTTTCTAACCTTTGATACGGTTTAACTTACCAGCTTGGACAGTTGGGATAAAATGAGGAGGGAACCAATGAGG
 MetLys
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 AAACCGTTGGGAAAATTTGTGCAAGCAACCGCACTACTCATTCTGTTGCTTTTAGTTTCATCGATCGATCGGCTACTGAGCAAGCAAGGAAATATTTAATTGGCTTTAATGAGCAG
 LysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPheSerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsnGluGln
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GAAGCTGTCAAGTGAATTTGTAGAACAGTAGAGGCAATGACGAGGTCGCCATTCTCTGAGGAAGAGGAGTGGAAATTTGAATTGCTTCATGAATTTGAACGATTCTGTTTATCC
 GluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIleLeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProValLeuSer
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 GTTGAAGTTAAGCCAGAGATGTGACGCGCTTGAACTCGATCCAGCGATTCTTATATTGAAGAGGATGCAGAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCATGGGAAHTTAGCCGTGTG
 ValLeuLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSerTyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSerArgVal
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CAAGCCCAAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGTTGTAAGGTTGCTGCTCGATACAGGTAATTCGACTCATCCAGACTTAATATTCTGTGTGGCGCTAGCTTTGTACCA
 GlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAlaValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPheValPro
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 GGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCAGCATGTGCTGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCACCAGCCGGAACATATACGCTGTT
 GlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThrIleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProAsnAlaGluLeuTyrAlaVal
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 AAAGTATTAGGGGAGAGCGTTTCAAGTTGCGTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAAATGGGAGGGGAACAAATGGCATGCAGTTGCTTATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCC
 LysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeuGluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerProSerAla
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 ACACTTGACCAAGCTGTTAATAGCGGACTTCTAGAGGCGTTCTGTTGTAGCGCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGCCCGTTATGGCAACGCAATGGCAGTC
 ThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAlaAlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMetAlaVal
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GGAGCTACTGACCAAAACAAACCGCGCCAGCTTTTCAGATGATGGCGAGGGCTTGACATTGTCGCACAGGTGTAAAGTGCAGAGCAGATACCCAGGTTCAAGGTATGCCAGCTTA
 G ThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGlyLeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAlaSerLeu
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AACGGTACATCATGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGGAGCCCTTGTAAACAAAGAACCCATCTTGGTCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAAACGCAACGAGCTTG
 AsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLysGlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgGlnHisLeuLysAsnThrAlaThrSerLeu
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GGAAGCAGGACTTGTATGGAGCGGACTTGTCAATGCAGAGCGGCAACAGCTAATCAATAAAGACGCTGTGCTTAAGGGCACAGCGTTTTTTTGTGATGATCGAAAAAGAGAC
 GlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg
 baigtis

Fig.5

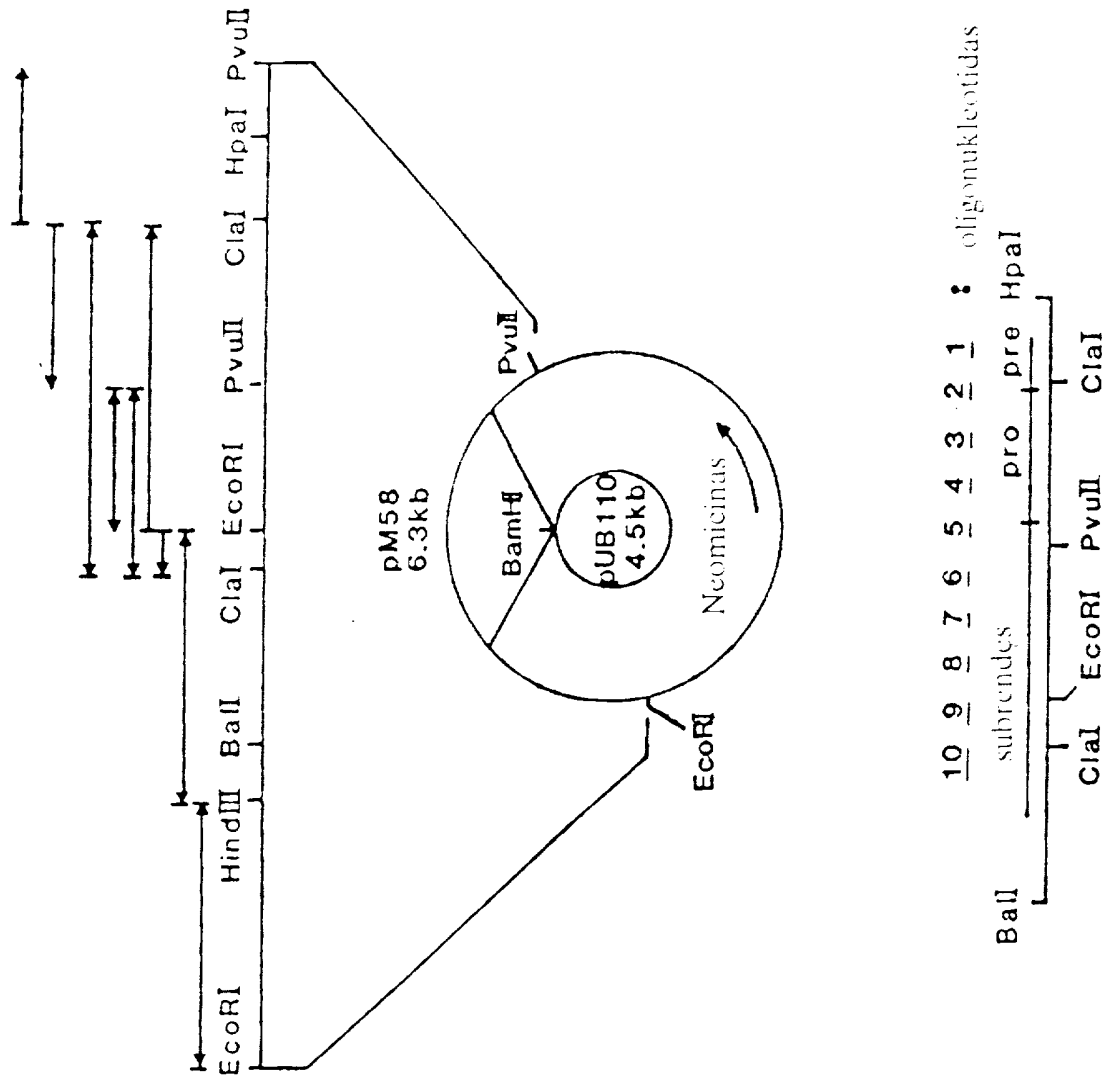


Fig.4

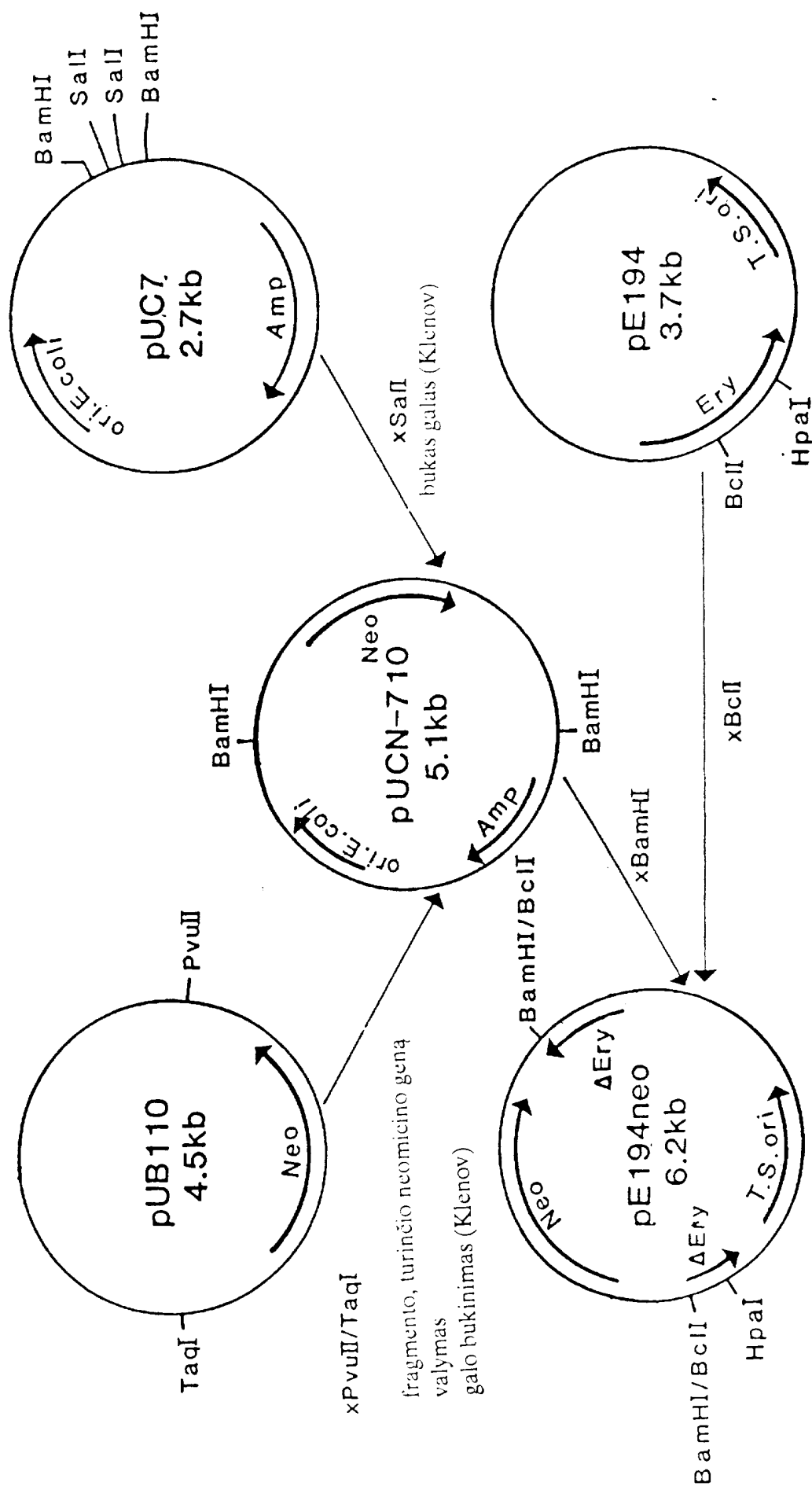


Fig.6a

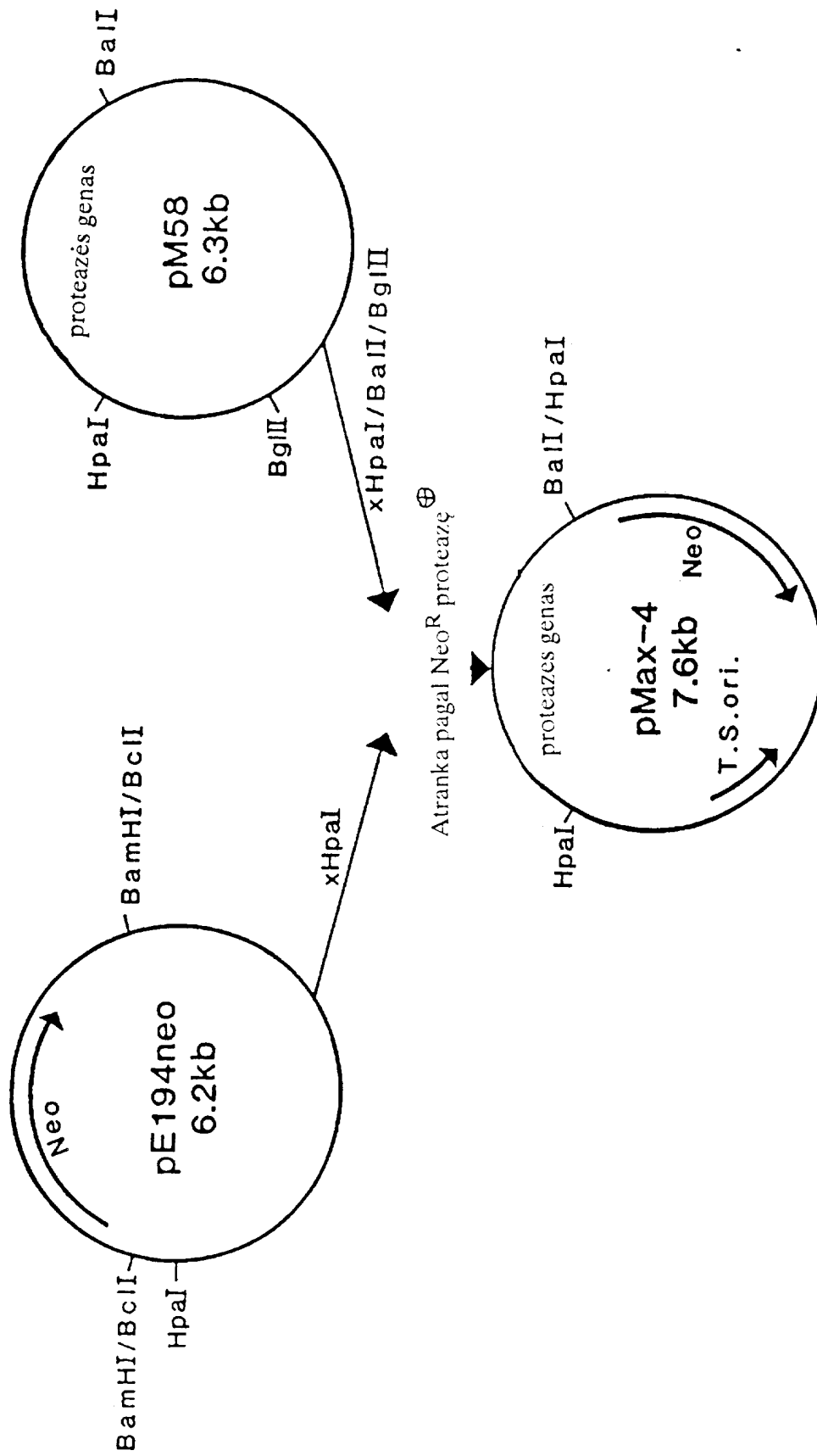
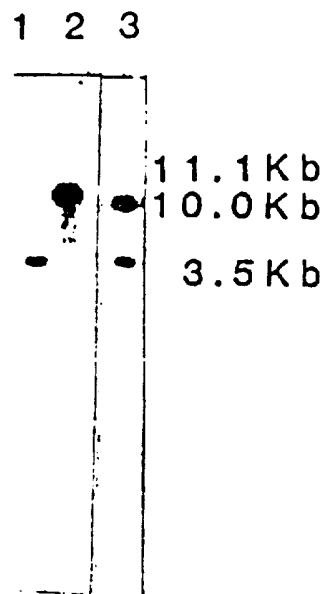


Fig.6b

LT 4001 B



1 takelis: PB92

2 takelis: PBT 109

3 takelis: PBT 108

Fig.7a

LT 4001 B

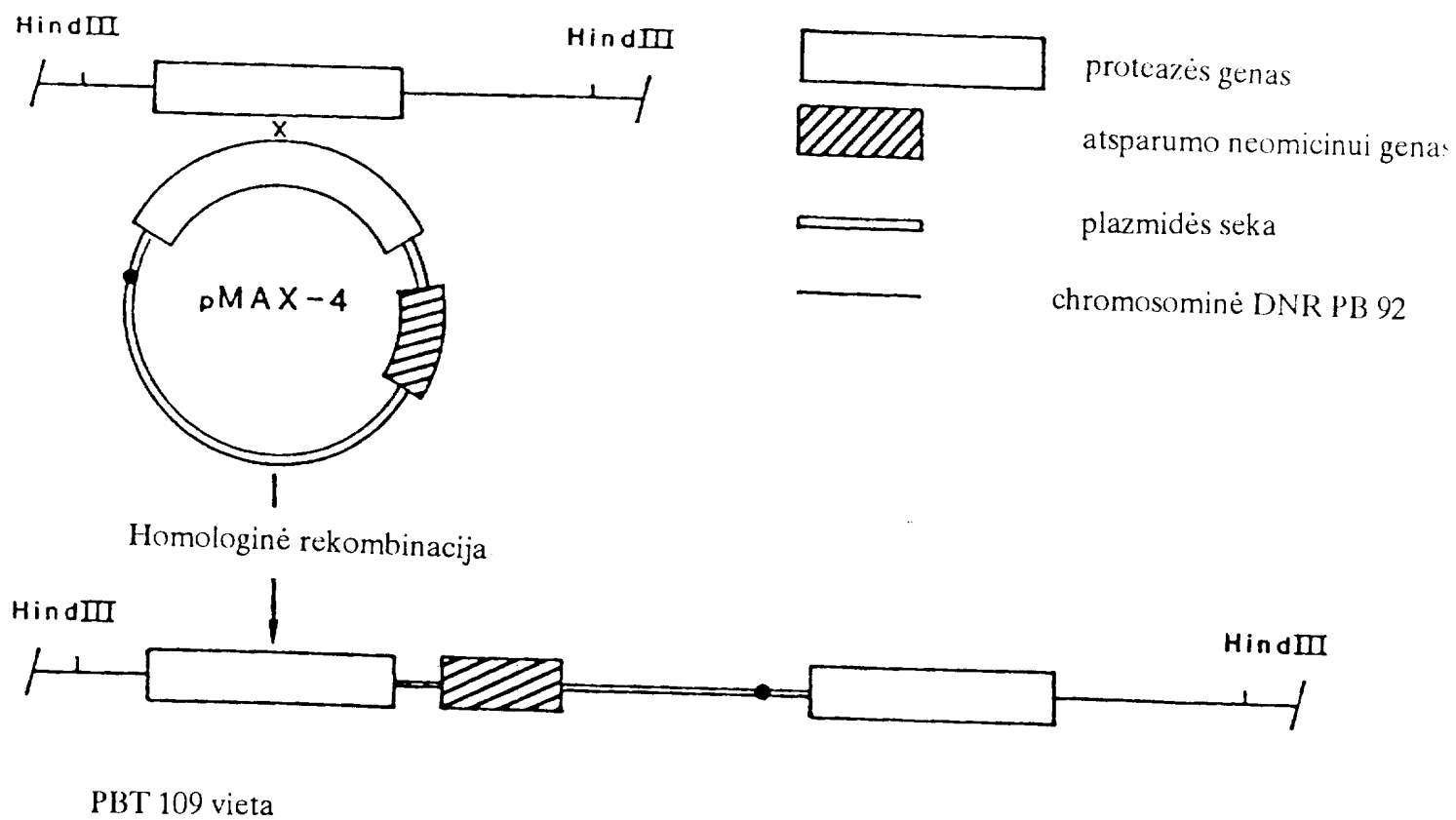


Fig.7b

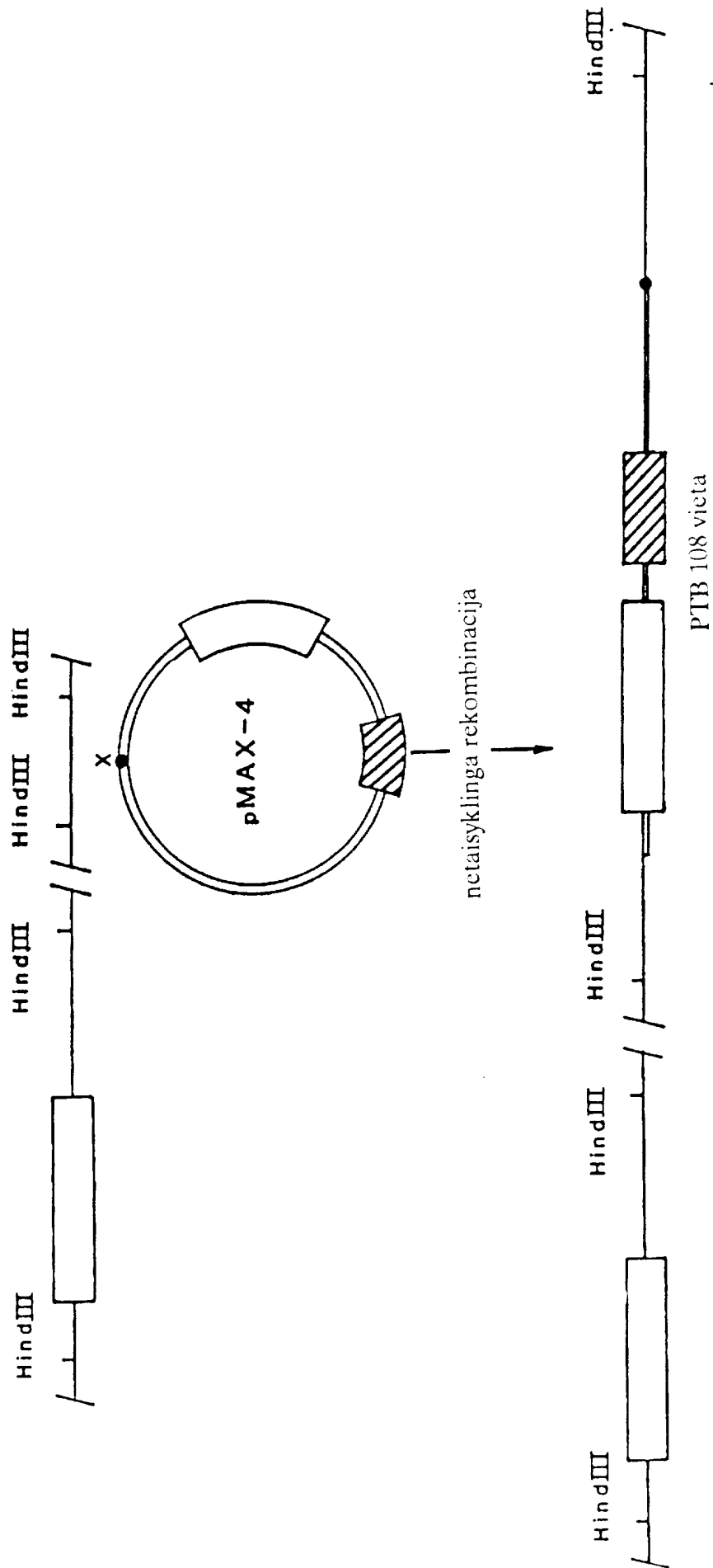


Fig.7c

INTEGRALINIO VEKTORIAUS KONSTRAVIMAS
pElatB

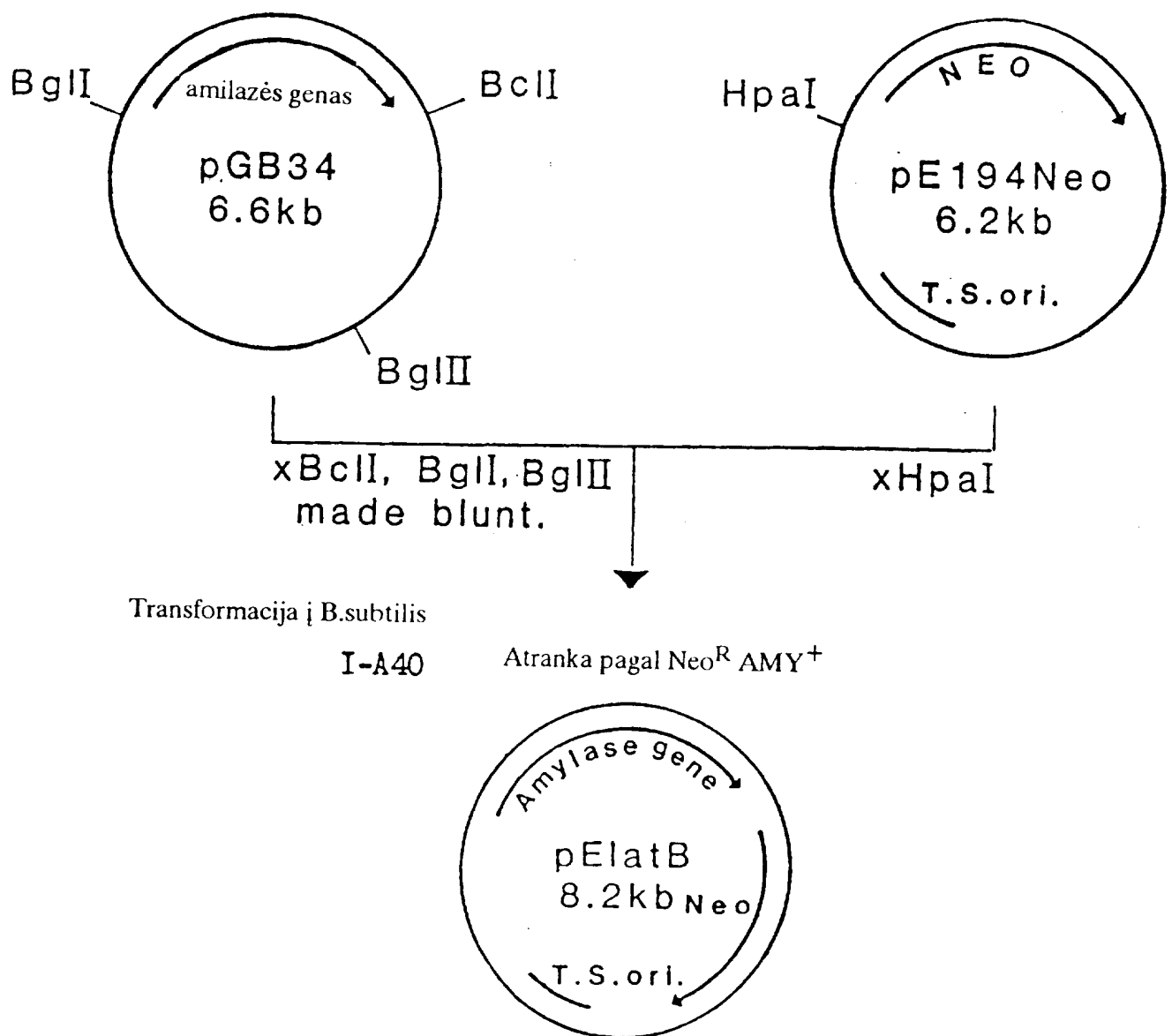


Fig.8

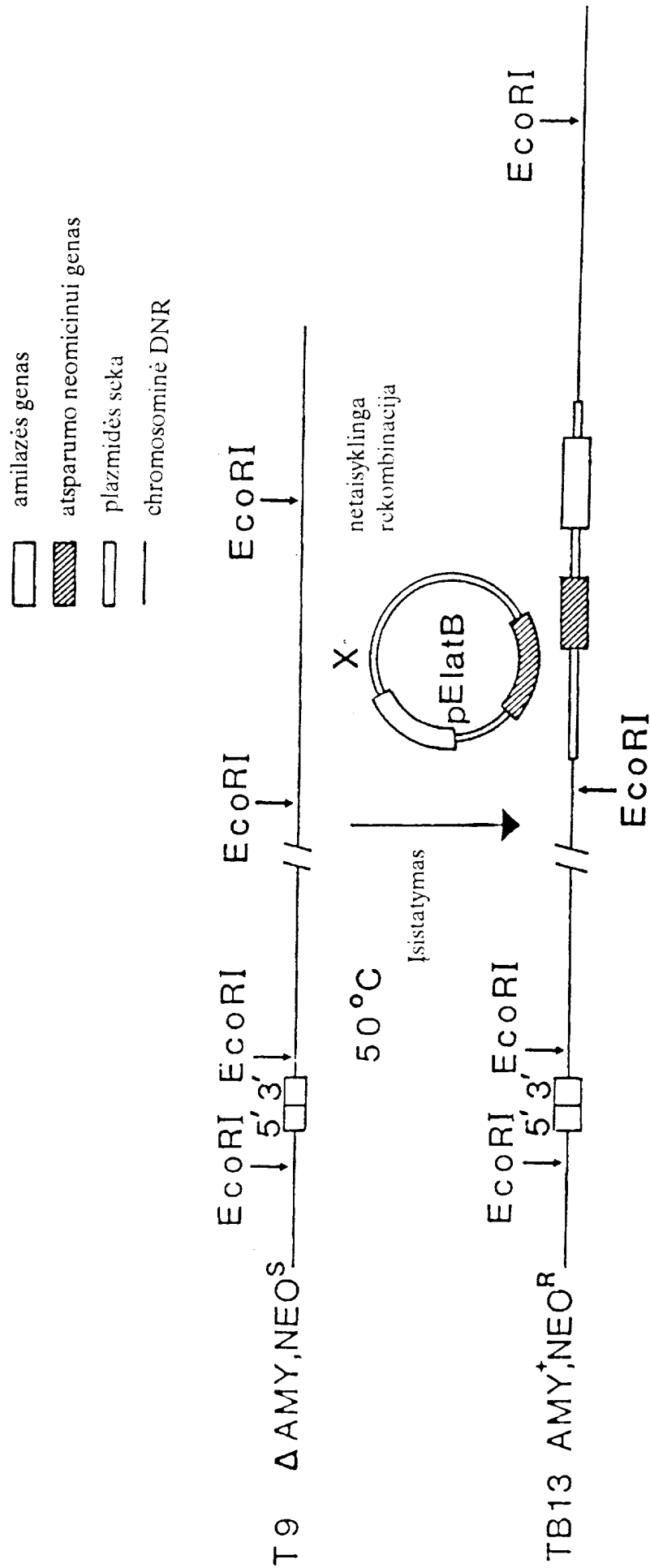


Fig.9a

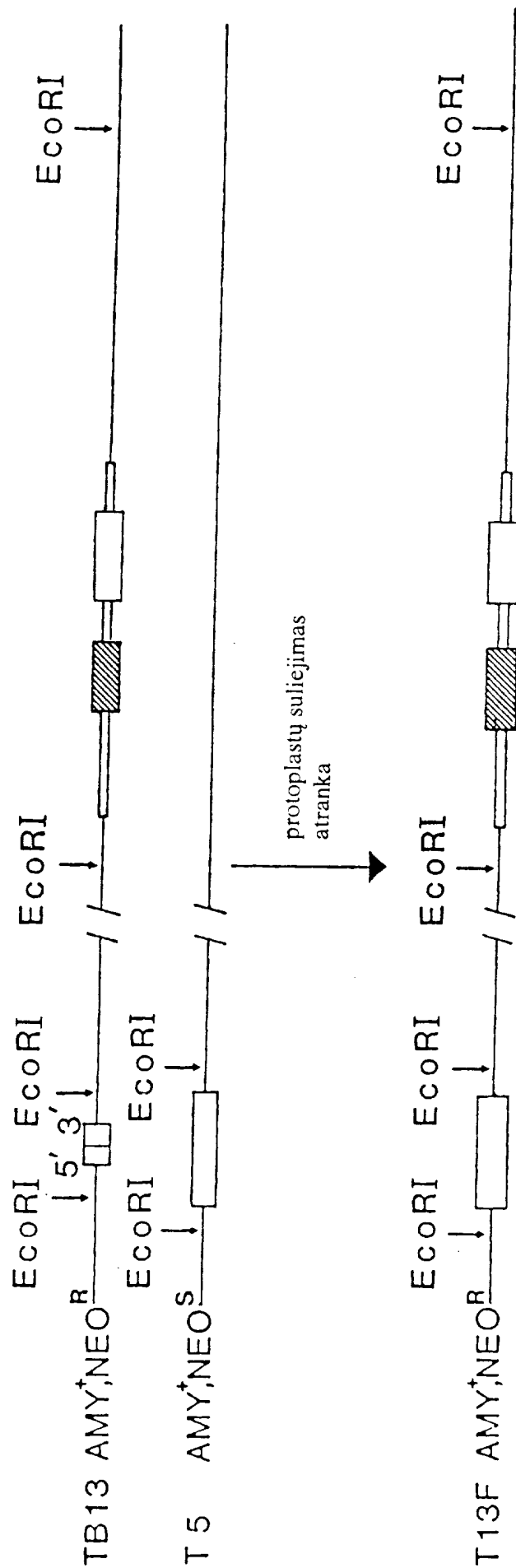


Fig.9b

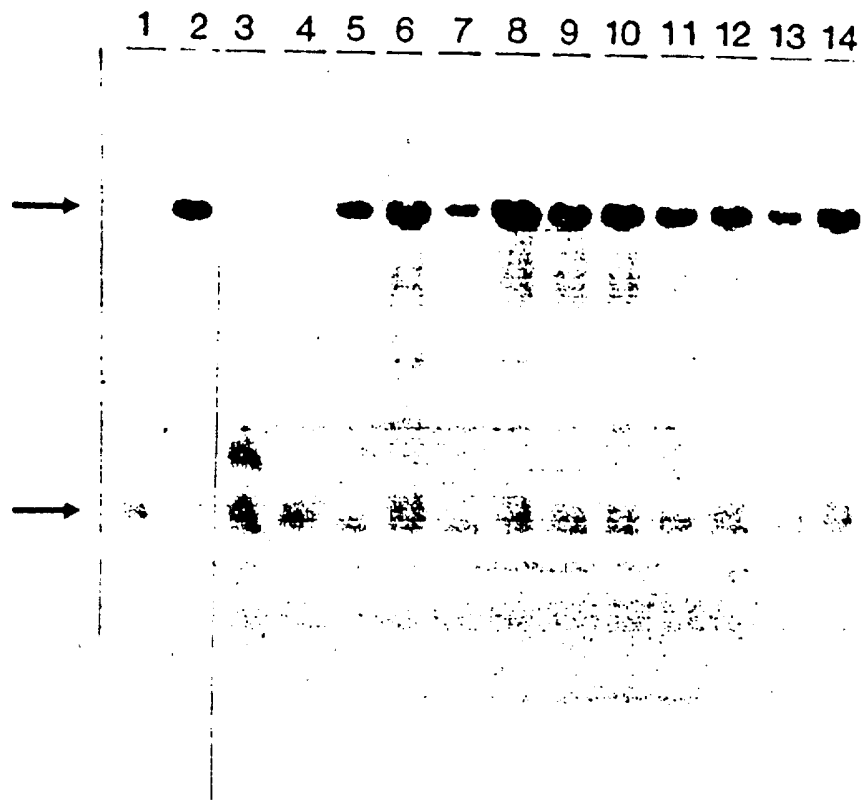


Fig.10