



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 34 742 T2** 2007.05.31

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 036 166 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 9/50** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 34 742.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NO98/00378**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 962 724.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/029836**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.12.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.06.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.05.2007**

(30) Unionspriorität:

**975826      11.12.1997      NO**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Aqua Bio Technology A/S, Eikelandssøsen, NO**

(72) Erfinder:

**WALTHER, Th., Bernt, N-5029 Bergen, NO; RONG,  
J., Chunjun, N-5029 Bergen, NO**

(74) Vertreter:

**Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679  
München**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN FÜR EXTRAKTION UND VERWENDUNG DER SCHLÜPF-FLÜSSIGKEIT DES ATLANTIKLACHSES**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Extraktion von endoproteolytischen Schlupfenzymen (Zonasen) im Abwasser von Brutanstalten, die Larven des Atlantischen Lachses produzieren, und weiterhin etabliert sie ein einfaches Verfahren, um Reinheit dieser speziellen Endoproteasen bis zur Eignung zur Sequenzierung zu erlangen, von denen sich herausgestellt hat, dass sie einige recht einzigartige proteolytische Eigenschaften besitzen.

**[0002]** Proteasen im gereinigten Zustand werden in der Forschung, in Labor- und Klinikanalysen und in Verfahren der Nahrungsmittelherstellung zunehmend verwendet. Die Nachfrage steigt, insbesondere nach Enzymen mit für spezifische Anwendungen angemessenen Eigenschaften. Dies hat die Suche nach neuen Quellen von Proteasen, die sichere, nachhaltige und wirtschaftliche Herstellungsverfahren erlauben, stimuliert.

**[0003]** Hier beuten wir eine neue, reiche Endoproteasenquelle aus, die mit der Aquakultur des Atlantischen Lachses verbunden ist. Ein essentieller Aspekt dieser Industrie ist die Produktion sich entwickelnder Eier, die ausschlüpfen und Larven hervorbringen, in Brutanstalten. Der Schlupf wird dadurch erreicht, dass die Embryonen Endoproteasen bilden, die, wenn sie sezerniert werden, die Eierschale effizient und spezifisch aufbrechen, um es der Larve zu ermöglichen, hinauszuschwimmen und ihr eigenes Leben zu beginnen (Referenzen: Yamagami 1988; Walther 1993).

**[0004]** Die kritischen Enzyme hinter dem Schlupf von Fischen sind nur bei einigen wenigen Fischarten charakterisiert worden, und in fast allen Fällen wurden diese Zonasen als Metalloproteasen interpretiert (Referenzen: Hagenmaier 1974; Ohzu & Kasuya 1979; Schoots & Denucé 1981; DiMichele et al. 1981; Yasumasu et al. 1989 a, b; Araki & Onozato 1990; Hung et al 1997). Die Genstruktur einiger Enzyme vom Zonasetyp ist erst in letzter Zeit verfügbar geworden (Ref.: Yasumasu et al. 1992). Luberda et al. (1994, Arch. Hydrobiol. 131(4), S. 505–511) beschreiben die teilweise Reinigung einer Metalloprotease aus der Schlupfflüssigkeit mehrerer Salmonidenarten. Rong und Walther (1994, 3. International Marine Biotechnology Conference: Programm, Zusammenfassung und Liste der Teilnehmer, „Endoproteolytic Hatching Enzyme from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Embryos“; Universität von Tromsø, Norwegen, S. 127) beschreiben die Reinigung von Choriolysin von 20 kDa aus dem Schlupffluid von Lachsen ohne synchronisiertes Ausschlüpfen. Araki et al. (1996, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53, S. 509–512) beschreiben die Isolation eines Schlupfenzym vom Choriolysintyp aus dem Schlupffluid des Masu-Lachses, ohne synchronisiertes Ausschlüpfen gewonnen.

**[0005]** Mutmaßliche Schlupfenzyme wurden auch bei Wirbellosen beschrieben, wo wiederum die meisten solcher Enzyme als Metalloproteasen interpretiert wurden (z. B. Barrett & Edward 1976; Lepage & Gache 1989, Roe & Lennarz 1990). Jedoch wurden einige starke Argumente für serinproteasenartige Zonasen vorgebracht (z. B. Post et al 1988). Umgekehrt wurden mutmaßliche Schlupfenzyme auch bei höheren Wirbeltieren als Fischen beschrieben. Z. B. beschrieben sowohl Urch & Hedrick (1981; mit Bezug auf Amphibien) als auch Yamazaki et al. (1994; mit Bezug auf die Maus) Zonasen, die Serinproteasen zu sein schienen. Der biologische und biochemische Sinn zweier verschiedener Zonasetypen bei ausschlüpfenden Tieren ist gegenwärtig nicht vollständig verstanden.

**[0006]** Wir fanden, dass die hauptsächlichen Zonasen beim Atlantischen Lachs Serinproteasen sind. Sie kommen in großen Mengen in den Abwässern und Schlupffluiden von Lachseiern vor. In diesem rohen wässrigen Zustand können Lachszonasen wirksam auf die Reinigung durch herkömmliche Techniken vorbereitet werden. Diese Zonasenquelle bietet im Vergleich zur Isolation von Enzymen aus ganzen Embryonen einen großen Vorteil, da sie wirksam Komplikationen mit überschüssigem Biomaterial (Eischalen, Embryonen und Larven) vermeidet. Auf diese Weise wird die Enzymaufreinigung erheblich vereinfacht.

**[0007]** Ein weiterer Vorteil ist, dass die auf eine Entwicklungsstufe eingestellten Lachseier vor dem Ausschlüpfen in minimale Wasservolumina übertragen werden können. Wenn in hohem Maße synchrones Ausschlüpfen durch erhöhte Temperaturen (Zimmertemperatur) oder durch Sauerstoffmangel (Open-Berntsen et al., 1990) induziert wird, ergibt dies ein kleines Volumen einer hochkonzentrierten Präparation roher Zonasen.

**[0008]** Ein weiterer essentieller Aspekt dieses Verfahrens ist, dass trotz der zunehmenden Konzentration der proteolytischen Zonasen beobachtet wurde, dass die Stabilität der enthaltenden Zonasen intakt blieb. Weiterhin ist es von Bedeutung, dass dieses Verfahren Zonaseenzyme in einem Medium aus beinahe reinem Wasser liefert, das höchstens 1 mM NaCl enthält, in dem die Zonasen aber dennoch volle enzymatische Integrität besitzen und sie über die Zeit hinweg behalten. Diese Präparation ist daher ein wertvolles Ausgangsmaterial für nachfolgende Präparationen proteolytischer Zonasen mit verschiedenen Reinheitsgraden bis zur sequenzierungsgeeigneten Reinheit.

**[0009]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Präparation, die ein als Zonase bezeichnetes Enzym enthält, wobei die Präparation bei SDS-PAGE-Analyse eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von

etwa 28 kDa aufweist und erhältlich ist durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfasst:

- a) Suspendieren von Lachseiern in einem minimalen Volumen Wasser;
- b) Induzieren des synchronisierten raschen Auschlüpfens der Lachseier;
- c) Filtrieren der ausgeschlüpften Lachseier, um Schlüpf fluid zu erhalten;
- d) Zugabe festen Harnstoffs zum Schlüpf fluid, um die Lachseierschalenfragmente dissoziieren zu lassen, und Zentrifugieren des Fluids bei niedriger Geschwindigkeit;
- e) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Gelfiltration des Zentrifugationsüberstandes; und
- f) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Affinitätschromatographie auf einer Benzamidin-modifizierten Superose 6B®-Säule, wobei die Affinitätschromatographie durchgeführt wird, indem man mit konzentrierten Salzlösungen wäscht, anschließend mit Dioxan in konzentrierter Salzlösung eluiert, um an die Chromatographiematrix oder an die makromolekularen Strukturen gebundene Zonasen zu extrahieren;

wobei die Zonase folgende Eigenschaften besitzt:

- a) sie spaltet Chromozym X;
- b) sie wird durch Benzamidin gehemmt;
- c) sie spaltet Peptidbindungen mit Arginin;
- d) sie bleibt in Gegenwart von 8 M Harnstoff, molaren Salzkonzentrationen, destilliertem Wasser und organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Dioxan oder Propanol, aktiv; und
- e) sie behält in Lösung bei Raumtemperatur 50 Tage lang ihre enzymatische Aktivität.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung einer Präparation, die ein als Zonase bezeichnetes Enzym enthält, bereit, das folgende Schritte umfasst:

- a) Suspendieren von Lachseiern in einem minimalen Volumen Wasser;
- b) Induzieren des synchronisierten raschen Auschlüpfens der Lachseier;
- c) Filtrieren der ausgeschlüpften Lachseier, um Schlüpf fluid zu erhalten;
- d) Zugabe festen Harnstoffs zum Schlüpf fluid, um die Lachseierschalenfragmente dissoziieren zu lassen, und Zentrifugieren des Fluids bei niedriger Geschwindigkeit;
- e) weiteres Aufreinigen der Zonasen durch Gelfiltration des Zentrifugationsüberstandes; und
- f) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Affinitätschromatographie, wobei die Affinitätschromatographie durchgeführt wird, indem man mit konzentrierten Salzlösungen wäscht, anschließend mit organischen Lösungsmitteln in konzentrierter Salzlösung eluiert, um an die Chromatographiematrix oder an die makromolekularen Strukturen gebundene Zonasen zu extrahieren.

**[0011]** Bevorzugte Ausführungsformen solcher Präparationen und Verfahren sind in den Ansprüchen beschrieben.

**[0012]** Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Inhibition der Proteolyse durch eine Lachszonase in einer erfindungsgemäßen Präparation, umfassend die Verwendung kleiner Mengen  $\beta$ -Mercaptoethanol und die Entfernung des Inhibitors durch Abdampfen, bereit. In einem noch weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Präparation zur Proteolyse oder reversen Proteolyse (Synthese) von Proteinen in reinem Wasser oder nicht-wässrigen organischen Lösungsmitteln bereit.

Beispiel 1: Konzentrierte Präparation roher Zonase des Atlantischen Lachses

**[0013]** Die anfängliche Reinigung der Zonasen umfasst nur die Filtration der ausgeschlüpften Lachseier durch Käseleinentuch. Ein solches Filtrat kann jahrelang ohne signifikanten Abbau der Zonase eingefroren sein, bevor es aufgetaut und für die weitere Aufreinigung der Zonase verwendet wird. Dieser Umstand erleichtert die Produktion eines Startmaterials zur Reinigung von Lachszonasen erheblich.

**[0014]** Der nächste Schritt umfasst die Einstellung der „Rohzonase“ auf üblicherweise 4 M Harnstoff, was die Fragmente der Lachseierschale dissoziieren lässt und es erlaubt, sie zusammen mit anderem Schutt durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (15000 g; 2  $\times$  15 Minuten) zu entfernen. Dieses Material zeigt keine Anzeichen für das Verstopfen von Säulen, was für auf andere Weise als oben beschrieben hergestellte Rohmaterialien charakteristisch ist. Es ist somit eine „Rohzonase“-Präparation verfügbar, die zur Reinigung durch herkömmliche chromatographische Techniken geeignet ist. Es sollte erwähnt werden, dass die Lachszonasen bei 4 oder sogar 8 M Harnstoff stabil und katalytisch aktiv sind. Überdies wird diese Lachszonasen-Präparation nur durch Inhibitoren für Proteasen vom Serinproteasentyp inhibiert.

Beispiel 2: Gereinigte Zonasen des Atlantischen Lachses

**[0015]** Das aus der „Rohzonase“-Präparation extrahierte Produkt kann in verschiedenen Reinigungsstufen ausgewählt werden. Jedoch sind die Zonasen bereits nach einer Runder der Gelfiltration von den höhermolekularen Bestandteilen in dem Filtrat mit einer 12-fachen Anreicherung mit mehr als 50 % Ausbeute abgetrennt. In der „Rohzonase“ vorliegende größere Bestandteile scheinen größtenteils lösliche Eierschalenfragmente zu sein, an die einige Zonasen fest gebunden sind. Es ist von zentraler Bedeutung, dass die Verunreinigung mit hohem Molekulargewicht in

diesem frühen Reinigungsschritt entfernt werden, da ihre Gegenwart ansonsten mit dem Erfolg der nachfolgenden Reinigungsschritte interferiert und ihn blockiert. In anderen Worten ist die Reihenfolge, in der die herkömmlichen Reinigungsverfahren angewandt werden, ein wesentlicher Aspekt des Verfahrens.

**[0016]** Die verwendete Matrix kann variieren, aber Sephacryl SR-200® ist unsere übliche Wahl. Der Puffer war Tris-HCl pH 8,0 oder pH 8,5 (0,05 M) oder Tris-Acetat (0,025 M, gleiche pH-Werte). Die nach den Gelfiltrationsverfahren erhaltenen Zonasen stellen die vorherrschenden Zonasen in der „Rohzonase“ dar, und die enzymatische Aktivität wurde durch Benzamidin katalytisch inhibiert.

**[0017]** Was die Proteine betrifft, stellen die Zonasen bereits auf dieser Stufe etwa 10 % des Materials dar. Diese teilweise gereinigte Lachszonase wird abermals nur durch Inhibitoren für Serinproteasen inhibiert.

Beispiel 3: Zonase als homogenes Proteinprodukt

**[0018]** Infolge der Zonaseinhibition durch Benzamidin können die auf Gelfiltrationssäulen zurückgehaltenen Enzymfraktionen ohne weiteres durch Affinitätschromatographie auf kommerziell verfügbaren Benzamidinsepharose-6B®-Säulen weiter gereinigt werden. Dieser Schritt erlaubt eine 7,5-fache Anreicherung für eine insgesamt 94-fache Anreicherung gegenüber der „Rohzonase“, mit einer Ausbeute von 37 % Aktivität.

**[0019]** Die verwendeten spezifischen Bedingungen (mit Säulen von 25 oder 125 ml Volumen) bestanden wiederum aus einem 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8 oder 8,5), der zur Entfernung unspezifisch gebundenen Materials von den Säulen auf 1 M NaCl eingestellt wurde. Die Zonasen werden durch diesen Schritt nicht entfernt, da sie fest an die Säule gebunden bleiben. Der Erfolg dieses Schrittes ist kritisch, da die Zonasen unter Verwendung eines 10–33 %-Dioxangradienten in 1 M NaCl im gleichen Tris-HCl-Puffer von der Säule eluiert werden. Dieses Verfahren beruht auf der ungewöhnlichen Stabilität von Lachszonasen in organischen Lösungsmitteln.

**[0020]** Nach der Affinitätsreinigung weist die Zonasepräparation bei SDS-PAGE-Analyse eine Proteinbande mit einem Gewicht von etwa 28 kDa auf. Dieser Zonaseteil war stark antigen, was die Herstellung polyklonaler Antikörper erlaubte, die spezifisch Lachszonasen erkennen, aber keine anderen Lachs-Serinproteasen wie z. B. Lachstrypsin. Umgekehrt erkennen polyklonale Antikörper gegen Lachstrypsin die Lachszonasen nicht, was die Lachszonase als eigenständiges Produkt des embryonalen Lachses etabliert. Jedoch hat dieses Zonaseprodukt keine zur Sequenzierung geeignete Reinheit,

wie durch Edman-Verfahren zur Ermittlung seiner N-terminalen Sequenz gezeigt. Jedoch wurde gezeigt, dass jenseits der üblichen 12 N-terminalen Sequenzierungsschritte die gesamte Aminosäuresequenz dieses Proteins reinen Zonasen ähnlich war. Diese hoch gereinigte Lachszonasepräparation wird ebenfalls nur durch Inhibitoren für Serinproteasen spezifisch inhibiert.

Beispiel 4: Zonase mit zur Sequenzierung geeigneter Reinheit

**[0021]** Durch Gelfiltration und Affinität gereinigte Lachszonasen können durch ein letztes chromatographisches Verfahren bis zur sequenzierungsgereinigten Reinheit weiter gereinigt werden. Dieses Verfahren setzt eine PBE94®-Säule mit einem Tris-Acetat-Puffer (10 mM, pH 9,0) ein, wobei die nachfolgende Elution mit einem Salzgradienten (bis 1 M NaCl-Salz) in diesem Puffer erfolgt. Dieser Schritt als solcher erhöht die katalytische Aktivität der Zonasen um einen weiteren Faktor von 7,6 und damit die gesamte Anreicherung auf das 714-fache bei einer Ausbeute von 28 % des Startmaterials.

**[0022]** Dieser Reinigungsschritt lässt die Proteinidentität der Zonasen als 28 kDa-Teil unverändert. Somit entfernt dieser Schritt keine unverwandten, wesentlichen Proteinverunreinigungen aus der Zonasepräparation, wie es bei der Proteinreinigung üblich ist und auch in den Beispielen 2 und 3 illustriert ist. Das Molekulargewicht der gereinigten Zonasen ist das gleiche, wie es durch Western Blotting-Techniken für die im Schlüpfmedium und in der „Rohzonase“ vorliegenden Zonaseteile beobachtet wird.

**[0023]** Was im dritten und letzten Chromatographieschritt offensichtlich stattfindet, ist, dass kleine, verunreinigende Peptide entfernt werden. Diese Peptide scheinen Oligopeptide mit ungefähr einem Dutzend Resten zu sein, die wahrscheinlich aus der Eierschale und/oder dem Lachsembryo stammen. Diese Peptidverunreinigungen scheinen inhibitorische Wirkungen auf die Zonase-Katalyse auszuüben, da ihre Entfernung die katalytische Aktivität der Zonase steigert. Ihre Gegenwart interferiert auch mit den ersten Schritten der Edman-Sequenzierung dieses Zonaseprodukts. Die in diesem dritten Reinigungsschritt beobachteten beiden Zonaseformen binden etwas unterschiedlich an die Säulenmatrix. Jedoch haben beide Formen in ihren N-terminalen Teilen ähnliche Aminosäuresequenzen.

**[0024]** Die teilweisen Aminosäuresequenzen der CNBr-erzeugten Peptide etablierten die Zonasen als eigenständige Proteine. Die Strukturanalyse ergab Hinweise, dass die Zonasen möglicherweise getrennte katalytische und substratbindende Domänen besitzen, was für ihre Empfindlichkeit gegenüber Calcium-chelierenden Mitteln, wenn sie auf makromole-

kulare (physiologische) Substrate einwirken (die Bindung wird inhibiert, und hierdurch wird die Katalyse indirekt inhibiert) und auch für ihre Empfindlichkeit gegenüber Serinprotease-Inhibitoren, wenn sie auf kleine Substrate einwirken (die Katalyse wird direkt inhibiert), verantwortlich sein könnte.

#### Beispiel 5: Chemische Eigenschaften von Lachszonasen

**[0025]** Die katalytische Wirkung der Zonasen wird durch die Gegenwart von Salz in molaren Konzentrationen nicht beeinflusst, sie sind in destilliertem Wasser ebenso effektiv wie in 6 M Salz. Das Enzym ist zwischen pH 7 und 9 im Wesentlichen gleichermaßen aktiv. Jedoch wird die Zonase unterhalb von pH 4 inaktiviert und ist bei pH 6 nur schwach aktiv. Die Zonase wird durch die Gegenwart von 8 M Harnstoff nicht beeinträchtigt. Die Zonase kann bei Raumtemperatur (mit und ohne Harnstoff) mit nur minimalen Verlusten enzymatischer Aktivität 50 Tage lang gelagert werden. Die enzymatische Aktivität wird auch durch 40 Vol.-% organischer Lösungsmittel wie Dioxan oder Propanol nicht behindert. Im Gegensatz hierzu wird das Enzym durch 10 Vol.-% 2-Mercaptoethanol, das nachfolgend durch Abdampfen bei 50 °C entfernt werden kann, ohne weiteres inaktiviert. Die Katalyse ist bei 42 °C maximal (bei Verwendung des kommerziellen Substrates Chromozym X (von Boehringer)), wobei oberhalb von 65 °C eine geringe, aber signifikante katalytische Wirkung beobachtet wird, ebenso nach 5-minütiger Erhitzung auf 90 °C und nachfolgender Abkühlung auf und Messung bei Raumtemperatur.

#### Beispiel 6: Katalytische Eigenschaften von Lachszonasen

**[0026]** Die fraglichen Lachszonasen spalten eine ganze Reihe von Chromozym-Substraten, wobei sie für Peptidbindungen mit basischen Aminosäuren (vorzugsweise Arginin) eine maximale Avidität zeigen. Auf diese kleinen künstlichen Substrate sind die Zonasen so wirksam wie andere Serinproteasen, aber der  $K_M$ -Wert = 14  $\mu$ M ist niedriger. Der  $V_{max}$ -Wert beträgt 1,3  $\mu$ M/min, und  $K_{cat}/K_M$  beträgt 57 (/mM sec), im Vergleich zu einem Wert von ungefähr 1 für Rinder- und Schweine-Trypsine (kationische Trypsine). Der hohe Grad der Spezifität bei der Spaltung von Peptidbindungen im Vergleich zu anderen Serinproteasen wie Trypsin wird durch die Verwendung von Eierschalen-zr-Proteinen (siehe Walther 1993) als Substrat gezeigt: Trypsin spaltet diese Proteine in viele kleine Fragmente, während bei den Zonasen beobachtet wird, dass sie das, was ihr physiologisches Substrat ist, kaum abbauen.

**[0027]** Die beobachtete Spezifität der Lachszonase-wirkung reflektiert natürlich genau das, was von einer Zonase verlangt wird: solche Enzyme müssen die

mechanische, aber nicht die chemische Integrität der Eierschalenproteine rasch zerstören, so dass der Embryo das Ei verlassen kann. Um dies in Gegenwart außerordentlich hoher Mengen des Eierschalensubstrates auf schnelle Weise zu schaffen, ist es notwendig, dass nur eine minimale Anzahl von Peptidbindungen spezifisch angegriffen werden. Bei verlängertem Kontakt mit ihrem Substrat spalten die Zonasen schließlich jedoch auch andere Peptidbindungen. Diese proteolytische Sequenzspezifität wurde beobachtet, aber noch nicht im chemischen Detail charakterisiert. Dennoch scheinen die Zonasen hervorragende Aussichten zu besitzen, wenn es darum geht, spezifische Spaltungen an verschiedenen Kandidatenproteinen durchzuführen, wie sie heute unter Verwendung anderer kommerzieller Enzympräparationen von Enzymen erreicht werden, die (andere) ortsspezifische Eigenschaften besitzen, z. B. die Boehringer-Produkte Asp-N und Glu-C. Somit nehmen die Zonasen einen gleichwertigen Rang ein wie die kommerziellen Enzyme, die Anwendung bei analytischer Arbeit in den Vorbereitungen zur Proteinsequenzierung gefunden haben, indem sie aus den zu sequenzierenden großen Proteinen definierte Peptide erzeugen. Somit ist dieses Merkmal der Enzymologie reiner Lachszonasen kommerziell wertvoll.

#### Referenzen auf verwandte Arbeiten (Kategorie A)

- Araki, K & Onozato, H (1990) *Develop., Growth & Differ.*, 32(4): 425  
 Barrett, D. & Edward, DF (1976) *Methods. Enzymol.* 45: 354–373  
 DiMichele, L. et al, (1981) *J. Exp. Zool.* 216(1): 133–140  
 Hagenmaier, HE (1974) *Comp. Biochem. Physiol.* 49B: 313–324  
 Hung, C-H, et al (1997) *J. Biol. Chem* 272(21): 772–13778  
 Lepage, T. & Gache, C (1989) *J. Biol. Chem.* 264(9): 4787–4793  
 Ohzu, E. & Kasuya, H. (1979) *Annot Zool. Japan* 52(2): 125–132  
 Oppen-Berntsens, D. et al (1990) *Aquaculture* 86: 417–430  
 Post, LL et al. (1988) *Biochem. Cell Biol.* 66(11): 1200–1209  
 Roe, JL & Lennarz, WJ (1990) *J. Biol. Chem.* 265(15): 8704–8711  
 Schoots, AF & Denucé M. (1981) *Int. J Biochem.* 13: 591–602  
 Urch, UA & Hedrick, J. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 424–431  
 Walther, BT (1993) in: *Physiol. Biochem. Aspects of Developing Fish Larvae* (pp.2–11) ISBN 82-992402-0-4. Bergen  
 Yamagami, K.(1988) in *Fish Physiol.* vol. 11: pp.447–499 San Diego  
 Yamazaki, K. al (1994) *Devel., Growth & Differ.* 36(2): 149–154

Yasumasu, S. et al (1989a) J. of Biochem. 105 (2): 204–211  
 Yasumasu, S. et al. (1989b) J. of Biochem. 105(2): 212–218  
 Yasumasu, S. et al (1992) Devel. Biology 153(29): 250–258

### Patentansprüche

1. Präparation, die ein als Zonase bezeichnetes Enzym enthält, wobei die Präparation bei SDS-PAGE-Analyse eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa aufweist und erhältlich ist durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfasst:

- a) Suspendieren von Lachseiern in einem minimalen Volumen Wasser;
- b) Induzieren des synchronisierten raschen Auschlüpfens der Lachseier;
- c) Filtrieren der ausgeschlüpften Lachseier, um Schlüpf fluid zu erhalten;
- d) Zugabe festen Harnstoffs zu dem Schlüpf fluid, um Lachseierschalenfragmente dissoziieren zu lassen, und Zentrifugieren des Fluids bei niedriger Geschwindigkeit;
- e) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Gelfiltration des Zentrifugationsüberstandes; und
- f) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Affinitätschromatographie auf einer Benzamidin-modifizierten Superose 6B®-Säule, wobei die Affinitätschromatographie durchgeführt wird, indem man mit konzentrierten Salzlösungen wäscht, anschließend mit Dioxan in konzentrierter Salzlösung eluiert, um an die Chromatographiematrix oder an makromolekulare Strukturen gebundene Zonasen zu extrahieren; wobei die Zonase folgende Eigenschaften besitzt:
- a) sie spaltet Chromozym X;
- b) sie wird durch Benzamidin gehemmt;
- c) sie spaltet Peptidbindungen mit Arginin;
- d) sie bleibt in Gegenwart von 8 M Harnstoff, molaren Salzkonzentrationen, destilliertem Wasser und organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Dioxan oder Propanol, aktiv; und
- e) sie behält in Lösung bei Raumtemperatur 50 Tage lang enzymatische Aktivität.

2. Präparation nach Anspruch 1, wobei die Gelfiltration auf Sephacryl SR-200® durchgeführt wird.

3. Präparation nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Verfahren zusätzlich einen Ionenaustauschchromatographie-Schritt beinhaltet und die Präparation eine zur Sequenzierung geeignete Reinheit aufweist.

4. Präparation nach Anspruch 3, wobei die Ionenaustauschchromatographie auf einer PBE94®-Säule durchgeführt wird.

5. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Schlüpf fluid vor Gebrauch jahrelang bei –80 °C oder monatelang bei Umgebungstemperatur

oder Raumtemperatur aufbewahrt wird.

6. Verfahren zur Herstellung einer Präparation, die ein als Zonase bezeichnetes Enzym enthält, das folgende Schritte umfasst:

- a) Suspendieren von Lachseiern in einem minimalen Volumen Wasser;
- b) Induzieren des synchronisierten raschen Auschlüpfens der Lachseier;
- c) Filtrieren der ausgeschlüpften Lachseier, um Schlüpf fluid zu erhalten;
- d) Zugabe festen Harnstoffs zu dem Schlüpf fluid, um Lachseierschalenfragmente dissoziieren zu lassen, und Zentrifugieren des Fluids bei niedriger Geschwindigkeit;
- e) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Gelfiltration des Zentrifugationsüberstandes; und
- f) weiteres Aufreinigen der Zonase durch Affinitätschromatographie auf einer Benzamidin-modifizierten Superose 6B®-Säule, wobei die Affinitätschromatographie durchgeführt wird, indem man mit konzentrierten Salzlösungen wäscht, anschließend mit Dioxan in konzentrierter Salzlösung eluiert, um an die Chromatographiematrix oder an makromolekulare Strukturen gebundene Zonase zu extrahieren.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Affinitätschromatographie auf einer Benzamidin-modifizierten Superose 6B®-Säule durchgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei das organische Lösungsmittel Dioxan ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei die Filtration auf Sephacryl SR-200® durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei das Verfahren zusätzlich einen Ionenaustauschchromatographie-Schritt beinhaltet.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Ionenaustauschchromatographie auf einer PBE94®-Säule durchgeführt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, wobei das Schlüpf fluid vor Gebrauch jahrelang bei –80 °C oder monatelang bei Umgebungstemperatur oder Raumtemperatur aufbewahrt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, wobei die Zonasepräparation bei SDS-PAGE eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa aufweist und die Zonase die in Anspruch 1 definierten Eigenschaften besitzt.

14. Verfahren zur Hemmung der Proteolyse durch eine Lachs-Zonase in einer in einem der Ansprüche 1 bis 5 definierten Präparation, wobei geringe Mengen an -Mercaptoethanol verwendet werden

und der Inhibitor durch Verdampfen entfernt wird.

15. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Proteolyse oder reversen Proteolyse (Synthese) von Proteinen in reinem Wasser oder nichtwässrigen organischen Lösungsmitteln.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen