Octrooiraad

(10)A **Terinzagelegging** (11) **8100853**

Nederland (19) **NL**

(54) **Plasmide DNA en werkwijze voor het verkrijgen daarvan.**

(51) Int.Cl³.: C12N 15/00.

(71) Aanvrager: The Upjohn Company te Kalamazoo, Michigan, Ver. St. v. Am.

(74) Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuyperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8100853.

(22) Ingediend 20 februari 1981.

(32) Voorrang vanaf 21 november 1980.

(33) Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 208861 .

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 16 juni 1982.

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

Plasmide DNA en werkwijze voor het verkrijgen daarvan.

Het is bekend, dat bacteriele plasmiden worden gebruikt voor recombinant DNA onderzoek. Voor een goed overzicht van de ontwikkeling op dit gebied wordt verwezen naar Science, Vol. 196, april 1977. Recombinant DNA onderzoek aan industrieel belangrijke micro-organismen van het genus Streptomyces is beschreven door Bibb, M.J., Ward, J.M., en Hopwood, D.A., 1978: "Transformation of plasmid DNA into Streptomyces at high frequency", Nature 274, 389-400.

Aan verscheidene Streptomyceten is vastgesteld, dat deze DNA plasmiden bevatten. Zie Huber, M.L.B. en Godfrey, O., 1978: "A general method for lysis of Streptomyces species", Can.J. Microbiol. 24, 631-632; Schrempf, H., Bufard, H., Hopwood, D.A. en Goebel, W., 1975: "Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from Streptomyces coelicolor A3(2)", J. Bacteriol 121, 416-421; Umezawa, H., 1977: "Microbial secondary metabolities with potential use in cancer treatment (Plasmid involvement in biosynthesis and compounds)", Biomedicine 26, 236-249; en Malik, V.S. 1977: "Preparative method for the isolation of cupercoiled DNA from a chloramphenicol producing Streptomycete, J.Antiobiotics 30, 897-899. Niettemin is tot nog toe slechts één Streptomyceet plasmide geisoleerd en beschreven door Schrempf supra. Dat in het genus Streptomyces nog andere plasmiden voorkomen, kan worden afgeleid uit resultaten van genetisch onderzoek beschreven door:

1) Akagawa, H., Okanishi, M. en Umezawa, H., 1975: "A plasmid involved in chloramphenicol production in Streptomyces venezuelae: Evidence from genetic mapping", J. Gen. Microbiol. 90, 336-346.
2) Freeman, R.F. en Hopwood, D.A., 1978: "Unstable naturally occurring resistance to antibiotics

in Streptomyces", J.Gen. Microbiol. 106, 377-381.

3) Friend, E.J., Warren, M. en Hopwood, D.A., 1978: "Genetic evidence for a plasmid controlling fertility in an industrial strain of Streptomyces rimosus, J. Gen. Microbiol. 106, 201-206.

4) Hopwood, D.A. en Wright, H.M. 1973: "A plasmid of Streptomyces coelicolor carrying a chromosomal locus and its inter-specific transfer", J. Gen. Microbiol. 79, 331-342.

5) Hotta, K., Okami, Y. en Umezawa, H., 1977: "Elimination of the ability of a kanamycin-producing strain to biosynthesize deoxystreptamine moiety by acryflavine", J. Antibiotics 30, 1146-1149.

6) Kirby, R., Wright, L.F. en Hopwood, D.A., 1975: "Plasmid-determined antiobiotic synthesis and resistance in Streptomyces coelicolor", Nature 254, 265-267.

7) Kirby, R. en Hopwood, D.A. 1977: "Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCPI plasmid of Streptomyces coelicolor A3 (2), J.Gen. Microbiol. 98, 239-252.

8) Okanishi, M., Ohta, T. en Umezawa, H., 1969: "Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in Streptomyces by episomic factors", J. Antibiotics 33, 45-47.

Gevonden is, dat een niet eerder beschreven plasmide, dat de code p UC2 kreeg gewonnen kan worden uit een cultuur van een microorganisme, dat onder nummer NRRL 12323 gedeponeerd is in de permanente verzameling van Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Services, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Ver.St.v.Amerika. Dit nieuwe plas-

mide, dat een molecuulgewicht van ongeveer 29,8 megadalton heeft wordt door restrictie endonuleasen afgebroken volgens het fragmentatiepatroon zoals weergegeven in het diagram en komt in 1-2 copien per cel S. fradiae NRRL 12323 voor. Het diagram is gebaseerd op plasmide p UC2 met een molecuulgewicht van ongeveer 29,8 ± 0,7 megadalton of een molecuullengte van ongeveer 45,0 kilobasen. De restrictieplaatsen zijn aangegeven als kilobase coordinaten ten opzichte van de Xba I restrictieplaats bij 0,0/45,0 kilobasen. De gebruikte afkortingen voor de restrictie endonucleasen zijn:

(1) Bgl II, een enzym uit Bacillus globigii:

(2) Hind III, een enzym uit Haemophilus influenzae en

(3) Xba I, een enzym uit Xanthomonas badrii.

pUC2 wordt uit Streptomyces fradiae NRRL 12323 geisoleerd door het mycelium van een cultuur te fragmenteren, de fragmenten te incuberen, de cultuur te oogsten, het mycelium te lyseren en het plasmide uit het lysaat te isoleren. Het plasmide is praktisch zuiver.

Omdat p UC2 door verschillende restrictie endonucleasen wordt afgebroken of "geknipt", kan het gemakkelijk worden gerecombineerd en aangepast voor een aantal gastheervektoren. p UC2 kan ook worden gebruikt als een klonerende vektor bij recombinant DNA onderzoek waarbij gekozen genen in het plasmide worden ingebouwd waarna het plasmide in een gastheerbacterie en/of vektor wordt ingebracht.

Karakteristieken van p UC2

Molecuulgewicht: ongeveer 29,8 megadalton.

Aantal copien per cel: 1-2

Restrictie endonuclease plaatsen (zie het diagram):

Aantal restrictieplaatsen		Aantal restrictieplaatsen	
Enzym	pUC2	Enzym	pUC2
BamHi	10	Hind III	2
EcoRI	0	Kpn I	10
Pst I	≥11	Xho I	9
Xba I	2	Sma I	≥12
Bgl II	4	Bcl I	5

Deze waarden werden verkregen door p UC2 DNA te fragmenteren bij aanwezigheid van een overmaat restrictie endonucleasen en het aantal in 0,7 en 1,0%-ige agarose gelen oplosbare fragmenten te bepalen.

pUC2 kan worden gebruikt voor het verkrijgen van recombinant plasmiden die in gastheerbacterien kunnen worden ingebracht. Daarbij wordt het DNA van het circulaire vectoriele plasmide met restrictie endonuclease, bijvoorbeeld Hind III of Xba I op specifieke plaatsen opengeknipt waarbij lineair DNA ontstaat. Tussen de uiteinden daarvan wordt een stukje vreemd, niet vektorieel DNA geplakt onder ringsluiting door de lineaire vektor of stukjes daarvan, en de niet-lineaire vektor te mengen bij aanwezigheid van een polynucleotide ligase.

Het vreemde DNA, verkregen met hetzelfde enzym, kan afkomstig zijn van hogere organismen. Zo kan bijvoorbeeld uit kikkers afkomstig DNA dat codeert voor ribosomaal RNA in pUC2 worden ingebouwd. Het circulaire recombinant plasmide bestaat dan uit p UC2 en een stukje kikker DNA.

Het recombinant plasmide kan in een gastheerorganisme worden ingebracht en daarin tot expressie komen. Voorbeelden van waardevolle genen zijn die welke coderen voor somatostatine, ratte-proinsuline en protaesen.

pUC2 ontleent zijn betekenis daaraan dat het in staat is om als plasmide vektor te functioneren in micro-organismen die voor industriele toepassingen van belang zijn zoals Streptomyces. Kloneren van DNA uit Streptomyces in pUC2 biedt de mogelijkheid om de vorming van economisch belangrijke produkten uit deze organismen, zoals antibiotica, te verhogen. Dit voorstel kan worden vergeleken met het kloneren van genen voor antibiotica in Escherichia coli K-12. Deze Gram-negatieve bacterie heeft echter het bezwaar, dat genen uit bepaalde Gram-positieve bacterien zoals Bacillus daarin niet goed tot expressie komen. Evenzo komen genen uit Gram-negatieve bacterien slecht of in het geheel niet tot expressie in Gram-positieve gastheren. Hiermee wordt het voordeel van een Gram-positief gastheervektorsysteem en daarmee de bruikbaarheid van pUC2 in een dergelijk systeem onderstreept.

Behalve bovengeschetste moeilijkheden met genexpressie, kunnen zich ook moeilijkheden voordoen bij het kweken van het micro-organisme en met de extractie en zuiverheid van het produkt. Aan deze moeilijkheden zou tegemoet kunnen worden gekomen door een plasmide vektor bijvoorbeeld pUC2 in te brengen in een gastheer die het product vormt en de genen voor het betreffende produkt in het plasmide te kloneren. Aldus zouden de moeilijkheden met fermentatie, extractie en zuivering in elk geval worden verkleind. Bovendien zou het in een dergelijk systeem niet noodzakelijk zijn om al de genen voor de biosynthese te kloneren en te vermenigvuldigen maar alleen de regulerende genen of genen die coderen voor de enzymen die de produktiesnelheid beheersen. Omdat pUC2 een streptomyceet plasmide is, leent het zich voor deze doeleinden bij uitstek in Streptomyces. Omdat pUC2 verder een plasmide uit een ram-positief micro-organisme is, kan het bovendien als vektor in een aantal andere micro-organismen zoals Bacillus en Arthrobacter

Streptomyces fradiae NRRL 12323 kan in een waterig voedingsmedium onder submerse aerobe omstandigheden worden gekweekt. Het voedingsmedium kan een koolstofbron bijvoorbeeld een assimileerbare koolhydraat bevatten en een stikstofbron bijvoorbeeld een assimileerbare stikstofverbinding of een proteine. Koolstofbronnen die de voorkeur hebben omvatten glucose, bruine suiker, sucrose, glycerol, zetmeel, maiszetmeel, lactose, dextrine, en molasse. Stikstofbronnen die de voorkeur hebben omvatten maisweekvloeistof, gist, geautolyseerde brouwersgist met vaste melkbestanddelen, sojaboonmeel, katoenzaadmeel, maismeel, vaste melkbestanddelen, pancreaties verteerd caseine, gistmeel, vaste destillateurs bestanddelen, dierlijke pepton vloeistoffen en vlees- en beender afval. Combinaties van voornoemde koolstof- en stikstofbronnen komen eveneens in aanmerking. Omdat verder kraanwater en ongezuiverde bestanddelen worden gebruikt alvorens het medium te steriliseren, is het niet nodig om spore-metalen zoals zink, magnesium, mangaan, kobalt en ijzer, toe te voegen.

Het geente medium wordt bij een temperatuur van ongeveer 18-50°C en bij voorkeur 20-37°C geincubeerd. Na ongeveer

3-15 dagen is de groei van het micro-organisme optimaal. Het medium blijft tijdens de groeicyclus zuur. De eind pH is gedeeltelijk afhankelijk van eventueel aanwezige buffer en gedeeltelijk van de begin pH van het medium.

Wanneer het kweken wordt uitgevoerd in grote vaten of tanks, verdient het voorkeur om in plaats van de sporevorm de vegetatieve vorm van het micro-organisme te gebruiken voor het enten om een al te grote laag in de groei van het micro-organisme te vermijden en daarmee ondoelmatig gebruik van de apparatuur. Om een vegetatieve ent te vormen worden een voedingsbouillon geent met een passend gekozen hoeveelheid van een kweek in een vloeibare agar, of een kweek in een schuine buis. De jonge, actieve vegetatieve ent wordt dan onder aseptische omstandigheden in een kweekvat of kweektank gebracht. Het medium waarin de vegetatieve ent wordt gevormd kan hetzelfde zijn als wordt gebruikt voor de groei van het micro-organisme.

Voorbeeld - Isolatie van pUC2 uit een zuivere cultuur van Streptomyces fradiae NRRL 12323

Sporen van een zuivere cultuur van Streptomyces fradiae, NRRL 12323 werden geent in 10 ml medium dat 1 gew.% glucose, 0,4 gew.% pepton, 0,4 gew.% gist-extract, 0,05 gew.% $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 gew.% KH_2PO_4 en 0,4 gew.% K_2HPO_4 bevatte. Het medium was tevoren gesteriliseerd in een 50 ml Erlenmeyerkolf. Na het enten werd de inhoud van de kolf ongeveer 24-36 uren geincubeerd bij 32°C in een Gump of New Brunswick rotatie-schud-inrichting bij een snelheid van 100-250 omw./min.

Na afloop werd 0,5 ml van de cultuur in een 50 ml Erlenmeyerkolf gemengd met 10 ml van bovengenoemd medium waaraan 0,5-2,0 gew./vol.% glycine was toegevoegd. De aanwezigheid van glycine is niet noodzakelijk maar bevordert de lyssi van de cellen. De hoeveelheid glycine in het medium kan overigens varieren maar wordt gewoonlijk zodanig gekozen dat de lysis van de cellen erdoor wrodt bevorderd. De inhoud van de kolf werd nog eens 24-36 uren geincubeerd bij 32°C in een Gump rotatie-schud-inrichting. Na afloop werd het mycelium van de cultuurvloeistof gescheiden door

centrifugeren bij lage snelheid zoals 6000 x g gedurende 15 min. bij 4°C gevolgd door afschenken van de bovenstaande vloeistof. Hierna werd het mycelium gesuspendeerd in 1,5 ml TES buffer (0,03 M tris-(hydroxymethyl)aminomethaan (Tris, 0,005 M EDTA en 0,05 M NaCl, pH 8,0) waaraan 20 gew./vol.% sucrose was toegevoegd. Na toevoegen van 0,3 ml van een 5 mg/ml oplossing van lysozym en 0,15 ml van een 1 mg/ml RNase in dezelfde buffer werd het mengsel 30 min. geincubeerd bij 37°C waarbij van tijd tot tijd werd geroerd. Na toevoegen van 0,6 ml 0,25 M EDTA (ph 8,0) werd het incuberen bij 37°C nog 15 min. voortgezet en na toevoegen van 0,3 ml 5 mg/ml pronase nog eens 10 min. bij 37°C. Na afloop werd de celsuspensie gelyseerd door toevoegen van 3,0 ml 2 gew.% sarkosyl bevattende TES buffer en werd 20-30 min. geincubeerd bij 37°C. Het lysaat werd daarna afgeschoven door het 5-10 keer door een 50 ml injectiespuit zonder naald te halen.

Het ruwe lysaat werd vervolgens gemengd met een zout bijvoorbeeld cesiumsulfaat en bij voorkeur cesiumchloride, en de ingevoegde kleurstof ethidiumbromide om een oplossing met een dichtheid van 1,550 te verkrijgen. De oplossing werd gecentrifugeerd tot evenwicht bij 145,000 x g (isopyknische dichtheidsgradient). Het covalent gesloten circulaire plasmide DNA was in de centrifugeerbuis onder langgolvige ultraviolette straling (320 nm) waarneembaar als een flauwe fluo-rescerende band onder de intens fluorescerende band van lineaire chromosomale en plasmide DNA's.

Het plasmide DNA werd uit de isopyknische gradienten verwijderd en het ethidiumbromide wordt geextraheerd door twee keer behandelen met 1/3 volume isopropanol waarna de waterige fase werd gedialyseerd tegen een buffer zoals een 0,1 X SSC buffer (0,015 M NaCl, 0,0015 M $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, pH 7,4) waarbij praktisch zuiver pUC2 wordt verkregen.

Karakterisering van pUC2

De grootte van pUC2 werd bepaald door sedimentatie in neutrale en basische sucrose gradienten onder gebruikmaking van een intern markeur plasmide DNA met een molecuulgewicht van ongeveer 28,0 megadalton en een overeenkomstige sedimentatiewaarde

van ongeveer 58S. Uit de neutrale sucrose gradienten werden de sedimentatie waarde van het geisoleerde pUC2 bepaald op 64S. Het molecuulgewicht werd berekend uit de vergelijkingen van Hudson et al (Hudson, B., Clayron, D.A. en Vinograd, J. (1968): "Complex mitochondrial DNA", Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol. 33, 435-442) en was in goede overeenstemming met de bepaling op grond van de basische sucrose gradienten.

Het molecuulgewicht van pUC2 werd ook bepaald door elektronenmicroscopie van afzonderlijke DNA moleculen (Kleinschmidt, A.K. (1968): "Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules": "Methode in Emzymology" (S.P. Colowick en N.O Kaplan, eds) Vol. 12B, blz. 361-377, Academic Press, New York).

Voor de gemiddelde contour lengte werd een waarde van 15,2 $\pm$ 0,6 /um gevonden en een overeenkomstig molecuulgewicht van 29,8 $\pm$ 0,7 megadalton.

Het percentage plasmide DNA in Streptomyces fradiae NRRL 12323 werd bepaald door de cultuur te merken met (methyl-3H)-thymidine, prepareren van de ruwe lysaten, en monsters van de lysaten te centrifugeren in cesiumchloride ethidiumbromide dichtheidsgradienten. De gradienten werden gefractioneerd en de radioactiviteit werd gemeten waarna uit het percentage radio-activiteit in de plasmideband het percentage plasmide DNA en het aantal plasmidecopien werden berekend (Radloff, R., Bauer, W. en Vinograd, J. 1967: "A dye-buoyant density methode for detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in Hela cells", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1514-1520).

Restrictie endonuclease fragmentering en agarosegel elektroforese

Restrictie endonucleasen werden als handelpreparaten verkregen van Miles Laboratories en New England Biolabs die ook de specificaties verschaften voor het fragmenteren met tenminste een tweevoudige overmaat endonuclease. Bij sommige bepalingen werd het plasmide DNA gefragmenteerd met meer dan één endonuclease. De bepalingen werden uitgevoerd volgens twee methoden. Volgens de eerste werd het plasmide DNA eerst gefragmen-

teerd met het enzym dat een lagere ionische sterkte behoeft en daarna met het enzym dat een hogere ionische sterkte behoeft na toevoeging van een gelijk volume 2X buffer van het tweede enzym. Volgens de tweede methode werden restrictiefragmenten van een enzym geisoleerd uit een preparatieve agarosegel zoals beschreven door Tanaka en Weisblum (Tanaka, T., en Weisblum, B. 1975" Construction of a colicin E1-R factor composite plasmid in vitro: Means for amplification of deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol, 121, 354-362).

De geisoleerde restrictiefragmenten werden geconcentreerd door ethanol precipitatie en daarna gefragmenteerd met andere restrictie enzymen. In duplo uitgevoerde fragmentaties werden vergeleken met enkelvoudig uitgevoerde fragmentaties om er zeker van te zijn dat geen abnormale restrictiepatronen werden verkregen, dat wil zeggen dat er niet een niet-specifieke splitsing van DNA optreedt na verandering van de ionische sterkte van het voor de fragmentering gebruikte mengsel.

De gefragmenteerde monsters werden opgebracht op 0,7 en 1 gew.% agarose gelen en 2 uren onderworpen aan elektroforese bij een constante spanning van 10-15 V/cm gel hoogte (Sharp, P.A., Sugden, J. en Sambrook, J., 1973: Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis, Biochemistry 12, 3055-3063). De molecuulgewichten van de fragmenten werden bepaald ten opzichte van de stndaardmigratiepatronen van bacteriofaag λ DNA gefragmenteerd met enzym EcoRI (Helling, R.B., Goodman, H.M. en Boyer, H.W. 1974: Analysis of endonuclease R.EcoRI fragments of DNA from lambdiod bacteriophages and other viruses by agarose-gel elektrophoresis, J. Virology 14, 1235-1244).

Al de beschreven proeven en bepalingen werden uitgevoerd volgens de specificaties in de NIH Guidelines.

C O N C L U S I E S

1. Plasmide DNA met het kenmerk, dat plasmide DNA met de code pUC2 in zuivere of praktisch zuivere toestand een molecuulgewicht bezit van ongeveer 29,8 megadalton en een restrictie endonuslease fragmenteringspatroon zoals weergegeven in het diagram.

2. Werkwijze voor het isoleren van plasmide DNA uit een micro-organisme, met het kenmerk, dat zuiver of praktisch zuiver pUC2 zoals omschreven in conclusie 1 wordt geisoleerd uit Streptomyces fradiae NRRL 12323 waarbij

(a) S.fradiae NRRL 12323 wordt gekweekt tot het mycelium voldoende is gegroeid,

(b) het mycelium wordt gefragmenteerd,

(c) het gefragmenteerde mycelium wordt geincubeerd,

(d) de cultuur wordt geoogst,

(e) het geoogste mycelium wordt gelyseerd, en

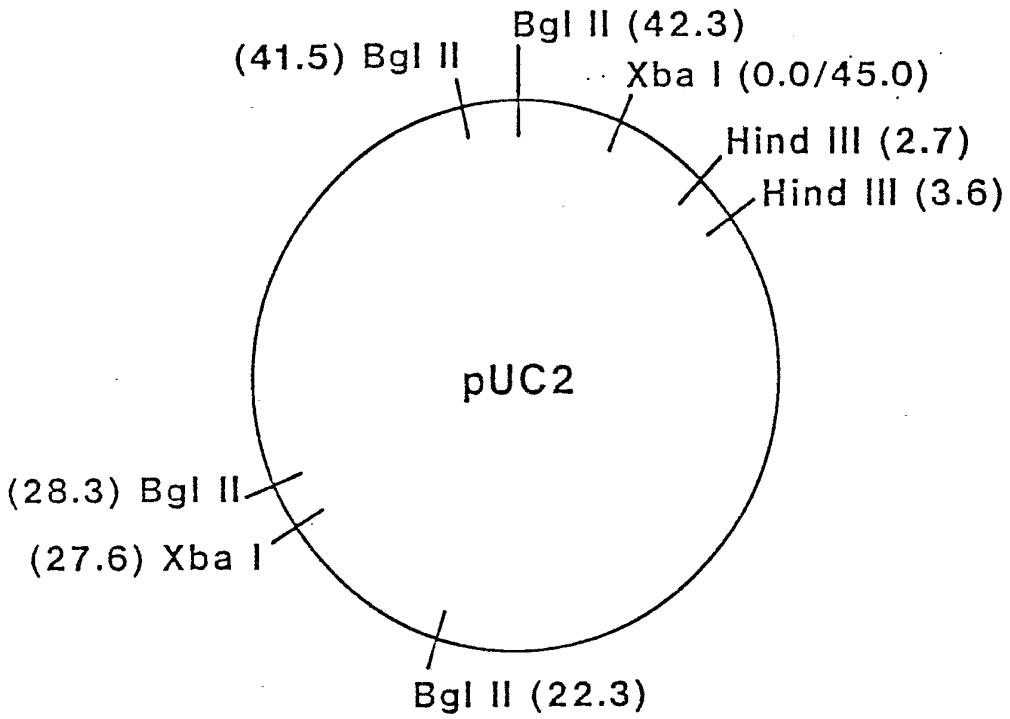
(f) uit het lysaat zuiver of praktisch zuiver pUC2 wordt geisoleerd.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het micro-organisme ongeveer 24-36 uren wordt gekweekt bij een temperatuur van ongeveer 32°C.

4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat het gefragmenteerde mycelium wordt geincubeerd in een glycine bevattend groeimedium.

5. Plasmide pUC2 verkrijgbaar met de werkwijze zoals beschreven in de beschrijving en het voorbeeld.

6. Produkten en werkwijzen zoals beschreven in de beschrijving en het voorbeeld.



The Upjohn Company, te Kalamazoo, Michigan, Ver.St.v.Amerika

8100853