



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 475

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N/ 2432 643

(22) 15.09.82

(44) 09.05.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) KRÜGEL, HANS-JOACHIM, DR.RER.NAT. DIPL.-BIOPHYS., DD; WALTER, FRIEDRICH, DIPL.-BIOCHEM., DD;
HARTMANN, MANFRED, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM., DD; KLAUS, SIEGFRIED, DR.RER.NAT. DIPL.-BIOL., DD;
NOACK, DIETER, DR.HABIL. DIPL.-PHYS., DD; SCHWARTZE, EBERHARD, DIPL.-PHYS., DD;
RAUTENSTEIN, JAKOB, PROF. DR.RER.NAT., SU; SOLOVJEWA, NINA J., DR.RER.NAT., SU;
MOSKALENKO, LEONORA N., DR.RER.NAT., SU; KRIMOVA, TATJANA P., DR.RER.NAT., SU

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES STREPTOMYCES-PLASMIDES

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Plasmids aus *Streptomyces chrysomallus* 2 (Stamm ZIMET 43686) mit dem Ziel, biochemische Hilfsmittel für die Gentechnik und die molekularbiologische Forschung sowie damit nachgelagert für die mikrobiologische Industrie zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß nach Kultivierung des Stammes ZIMET 43686 das Mycel lysiert und die DNS des Plasmids pMG 200 isoliert wird. Das Plasmid pMG 200 stellt in bezug auf das geringe Molekulargewicht, in bezug auf die Restriktase-Spaltorte, insbesondere in bezug auf das Vorhandensein eines unikalenen BglII-Spaltortes, sowie auch in bezug auf Besitz einer invertierten Duplikation eine neue Qualität unter den *Streptomyces*-Plasmiden dar.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Gewinnung eines Streptomyces-Plasmides

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Streptomyces-Plasmides mit neuartigen Restriktase-Spaltorten, die vorteilhaft für die Konstruktion von Vektorplasmiden für dieses Wirtssystem sind. Die Erfindung bietet Anwendungsmöglichkeiten in der Gentechnologie sowie auf anderen Gebieten der DNS-Forschung und nachgelagert damit in der Veterinär- und Humanmedizin, in der Pflanzen- und Tierproduktion, in der Nahrungsmittelerzeugung und in der pharmazeutischen Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß durch geeignete Verfahren aus einigen Stämmen der Gattung Streptomyces Plasmide isoliert werden können.

So wird in der Patentschrift EP 0006692 (Erfinder: M. BIBB, D. HOPWOOD) ein Verfahren zur Gewinnung mehrerer Plasmide aus Streptomyces coelicolor beschrieben (Plasmide der pIJ-Serie).

In den Offenlegungsschriften DE 3008647, DE 3008645, DE 3005225, DE 3005226, DE 3011995, DE 3008646 sowie DE 3008648 werden Verfahren dargelegt, die zur Isolierung von Plasmiden aus Streptomyces fradiae und Streptomyces

espinosus führen (Plasmide der pUC-Serie), und die Patentschrift EP 0038156 enthält ein Verfahren für die mikrobiologische Präparation eines Plasmids aus Streptomyces erythreus (Plasmid pUC 10).

Diese Verfahren sind generell durch folgenden Grundaufbau charakterisiert:

Der jeweils herangezogene potentiell Plasmid-haltige Streptomyces-Stamm wird in einem geeigneten Medium bis zu ausreichendem Mycelwachstum kultiviert. Anschließend wird das Mycel fragmentiert, und das fragmentierte Mycel wird in einem geeigneten Kulturmedium inkubiert. Diese Kultur wird nach geeigneter Zeit geerntet, das geerntete Mycel wird lysiert, und aus dem Lysat werden schließlich die jeweiligen Streptomyces-Plasmide abgetrennt.

Nachteil dieser Verfahren ist, daß sie bisher zu keinen Plasmiden mit Molekulargewichten unter 6,5 MD geführt haben, die gleichzeitig über eine günstige Kombination geeigneter Restriktase-Spaltorte und über invertierte Duplikationen verfügen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung dient der Gewinnung eines neuen Plasmids mit neuartigen Spaltorten für restriktive Endonukleasen, um den aufgeführten Mangel der bisherigen Verfahren zu vermeiden, um die Palette der für die Gentechnik nützlichen Plasmide um diesen Vertreter zu erweitern, insbesondere um Vektoren für die in-vitro-Manipulation von Streptomyceten herstellen zu können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein biochemisches Verfahren anzugeben, mit dem ein neues Plasmid für Streptomyceten gewonnen werden kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß nach Kultivierung in glycinhaltigem Medium und durch Einwirkung von Lysozym aus dem Wirtsorganismus Streptomyces chrysomallus 2 die DNS isoliert wird und durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation die im wesentlichen reine Plasmid-DNS von der chromosomalen DNS abgetrennt wird.

Der Stamm Str.chrysomallus 2 ist in der Hinterlegungsstelle des ZIMET der AdW der DDR, DDR-69 Jena, Beutenbergstr. 11 unter der Nr. ZIMET 43686 hinterlegt. Er wurde im Rahmen vertraglicher Vereinbarungen vom Institut für Mikrobiologie der AdW der UdSSR, Moskau, aus der Stammsammlung der Moskauer Staatlichen Universität übernommen. Durch N. J. Solowjewa und Mitarbeiter wurde dieser Stamm untersucht; dabei wurde in ihm ein defekter Prophage nachgewiesen (siehe N. J. Solowjewe et. al., Mikrobiologija; Moskwa, Verlag Nauka; im Druck).

Im einzelnen ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß

- Sporen von Str.chrysomallus 2 (Stamm ZIMET 43686) in für Streptomyceten an sich bekannter Weise bei 20 °C bis 40 °C, vorzugsweise 28 °C, im Bereich von pH 6 bis pH 8, vorzugsweise bei pH 7, unter Zusatz von 10%iger Glycinlösung nach Auskeimung der Sporen bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % bis 2,0 %, vorzugsweise 1,0 %, für die Dauer von 12 h bis 120 h, vorzugsweise 72 h, kultiviert werden;
- die Kultur durch Zentrifugation geerntet wird und das Mycel nach Waschung mit NaCl-Lösung durch Wirkung von Lysozym lysiert wird;
- mit Detergenzlösung hieraus ein Klarlysat hergestellt wird, aus dem mit Polyäthylenglykol-Lösung die Gesamt-DNS ausgefällt wird und
- durch anschließende CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aus dieser DNS-Lösung die im wesentlichen reine DNS des neuen Plasmids pMG 200 isoliert wird.

Plasmid pMG 200 weist ein Molekulargewicht von 4,42 MD sowie

- einen unikalén Spaltort für die restriktive Endonuklease Bgl II,
- je zwei Spaltorte für die restriktiven Endonukleasen BamH I, Kpn I, Pst I und Pvu II,
- eine invertierte Duplikation

an jeweils definierter Position der physischen Karte auf (siehe Abbildung).

Ausführungsbeispiel

Sporen von Str.chrysomallus 2 (Stamm ZIMET 43686) werden durch Schütteln mit Glaskugeln ($\varnothing$ 3mm) von der Substratoberfläche gelöst und in Medium M 79

- 1 % Dextrose
- 1 % Pepton
- 0,2 % Hefe-Extrakt
- 0,6 % NaCl
- 1,1 % Kasein-Hydrolysat

resuspendiert. 10^7 Sporen je ml Medium in Proben a 70 ml in 250 ml-Steilbrustflaschen werden 72 h bei 28 °C auf einem Schütteltisch kultiviert. Nach ca. 6 h Kultivierungsdauer werden 7 ml einer 10%igen Glycin-Lösung je Probe zugesetzt. Das durch Zentrifugation geerntete Mycel wird zweimal in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und nach dem letzten Waschgang im doppelten Volumen (2 x V) des Mycelpellets in Saccharose-Lösung

- 25 g Saccharose
- 5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0
- add 100 ml H₂O

resuspendiert.

Danach wird 1/4 x V Lysozym-Lösung

- 125 mg Lysozym
- 6.12 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0
- add 25 ml H₂O

zugegeben und für 30 min bei 28 °C bis 37 °C inkubiert. Nach

Abkühlung auf 4 °C wird 3/10 x V 0.25 M Na₃ EDTA, pH 7.5 bis 8.0, zugegeben und vermischt. Anschließend wird 1 x V Detergenzlösung

1 g Brij
0.4 g Desoxycholat
62.4 ml 0.1 M Na₃ EDTA
5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0
add 100 ml H₂O

vorsichtig untergerührt und für 5 min im Eisbad inkubiert. Dieses Lysat wird für 60 min bei 20000 Upm zentrifugiert und der Überstand nach Zugabe von 1/10 V 5 M NaCl und 1/3 x V Polyäthylenglykol-Lösung

100 g PEG
20 ml 5 M NaCl
10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0

add 200 ml H₂O

16 h bei 4 °C inkubiert. Diese Mischung wird 30 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
5 mM Na₃ EDTA
50 mM NaCl

resuspendiert.

In 4.7 ml DNS-Lösung werden 5 g CsCl gelöst und 0.3 ml Ethidium-Bromid-Lösung zugegeben. Nach Dichtegradientenzentrifugation von 40 h bei 37000 Upm bei 15 °C wird die untere der beiden bei Bestrahlung mit UV-Licht aufleuchtenden Banden isoliert und mit wassergesättigtem Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die Dialyse erfolgt gegen den Lösungspuffer.

Aus 100 ml Kulturvolumen können dabei ca. 30 µg im wesentlichen reine PMG 200-DNS isoliert werden.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung eines Streptomyces-Plasmides, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - Sporen von Streptomyces chrysomallus 2 (Stamm ZIMET 43686 auf einem Kulturmedium, wie es für die Streptomyceten-Zucht an sich bekannt ist, bei einer Temperatur von 20 °C bis 40 °C unter Zusatz von Glycin in der Endkonzentration von 0,5 % bis 2,0 % im Bereich von pH 6 bis pH 8 für die Dauer von 12 h bis 120 h wachsen läßt,
 - anschließend die Kultur erntet, das Mycel durch Einwirkung von Lysozym lysiert und
 - aus dem Lysat durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation im wesentlichen reines Plasmid pMG 200 isoliert, welches durch ein Molekulargewicht von 4,42 MD sowie durch den Besitz
 - a) eines unikalten Spaltortes für die restriktive Endonuklease Bgl II,
 - b) je zweier Spaltorte für die restriktiven Endonukleasen BamH I, Kpn I, Pst I und Pvu II,
 - c) einer invertierten Duplikation
 in definierter Position seiner physischen Karte charakterisiert ist.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man Sporen von Streptomyces chrysomallus 2 (Stamm ZIMET 43686) in glycinhaltigem (Endkonzentration 1 %) Medium M 79 bei pH 7 für die Dauer von 72 h bei einer Temperatur von 28 °C kultiviert.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

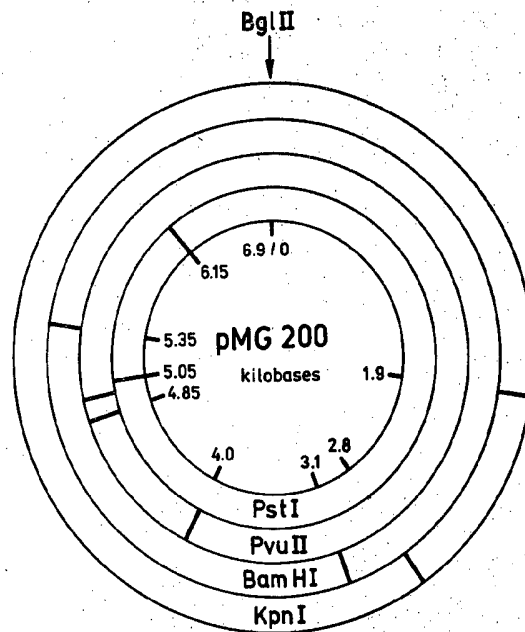


Abb. 1: Karte der Spaltorte für die restriktiven Endonukleasen Bgl II, Kpn, BamH I, Pvu II und Pst I auf Plasmid pMG 200.