Octrooiraad

(10) A **Terinzagelegging** (11) **8001464**

Nederland (19) **NL**

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

(51) Int.Cl³.: C07H21/04.

(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. 8001464.

(22) Ingediend 12 maart 1980.

(32) Voorrang vanaf 19 maart 1979.

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

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 22201 .

(23) - -

(61) - -

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 23 september 1980.

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 bacteriële 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, 398-400.

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., Bujard, 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. Niettemin zijn tot nog toe slechts drie Streptomyceet plasmiden geïsoleerd en beschreven door Schrempf supra. Dat in het genus Streptomyces nog meer 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 venecuelae: 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 acriflavine". J.Antibiotics 30, 1146-1149.

(6) Kirby, R., Wright, L.F. en Hopwood, D.A. 1975. "Plasmid-determined antibiotic 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.

(9) Okanishi, M. 1977: Involvement of plasmids in the production of secondary metabolites, Amino Acid-Nucleic Acid 35, 15-30.

(10) Schrempf, H. en Goebel, W. 1977: Characterization of a plasmid from Streptomyces

coelicolor A_3, J.Bacteriol. 131, 251-258.

(11) Shaw, P.D. en Piwowarski, J. 1977: Effect of ethidium bromide and acriflavine on streptomycin production by Streptomyces bikiniensis, J.Antibiotics 30, 404-408.

(12) Yagisawa, M., Huang Rossana T-S., en Davies, J.E. 1978: Possible involvement of plasmids in biosynthesis of neomycin, J.Antibiotics 31, 809-813.

In Journal of Antibiotics, Vol. XXX No. 10, 897-899 is door Dr. Vedpal S. Malik een methode beschreven voor het isoleren van plasmide DNA.

Gevonden is, dat het micro-organisme Streptomyces sp.3022a NRRL 11441 een niet eerder beschreven plasmide bevat. Dit plasmide, dat de code p UC3 kreeg, bezit een molecuulgewicht van ongeveer 20 x 10^6 dalton en wordt door restrictie endonuleasen afgebroken volgens het fragmentatiepatroon zoals weergegeven in het diagram, dat is gebaseerd op plasmide p UC3 met een molecuulgewicht van ongeveer 20 x 10^6 dalton en een molekuullengte van ongeveer 30 kilobase paren. De restrictieplaatsen zijn aangegeven als percentages waarbij de totale plasmidelengte op 100% is gesteld en één van de EcoRI restrictieplaatsen op 0%. De gebruikte afkortingen voor de restrictie endonuleasen hebben de volgende betekenis:

(1) EcoRI, een enzym uit Escherichia coli;
(2) HindIII, een enzym uit Hemophilus influenzae;
(3) XhoI, een enzym uit Xanthomonas holcicola;
(4) PstI, een enzym uit Providencia stuartii; en
(5) BglII, een enzym uit Bacillus globigii.

pUC3 wordt verkregen uit Streptomyces sp. 3022a NRRL 11441. Deze biologisch zuivere cultuur is gedeponeerd bij de permanente collectie van het Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Amerika, onder voornoemd nummer, en is beschreven door

(1) Smith, C.G. 1958: Effect of halogens on the

Chloramphenicol fermentation, J. of Bacteriol. 75: 577-583.;

(2) Vining, L.C. en D.W.S. Westlake (1964): Biosynthesis of the phenylpropanoid moiety of chloramphenicol, Can.J. of Microbiol. 10: 705-716.; en

(3) Malik, V.S. en L.C. Vining (1970): Metabolism of Chloramphenicol by the producing organism, Can.J. of Microbiol. 16: 173-179.

Karakteristieken van pUC3

molekuulgewicht: ongeveer 20 x 10^6 dalton.

restrictie endonuclease plaatsen (zie het diagram):

aantal plaatsen		aantal plaatsen	
enzym	pUC3	enzym	pUC3
BgII	> 10	BgIII	4
BamHI	4	HpaI	0
		HindIII	1
EcoRI	3	KpnI	> 5
PstI	5	PvuII	9
MboII	> 10	AvaI	> 10
XbaI	geen	XhoI	2
SaII	> 10	HphI	> 10
HaeII	> 7	HinfI	> 10
SmaI	> 10	HincII	> 10

Deze waarden werden verkregen door fragmentering van DNA bij aanwezigheid van overmaat restrictie endonuclease en bepaling van het aantal fragmenten oplosbaar in 0,7 of 1,0%-ige agarose gelen.

pUC3 kan worden gebruikt voor het verkrijgen van recombinant plasmiden die in gastheerbacteriën kunnen worden ingebracht. Daarbij wordt het DNA van het circulaire vectoriële plasmide met een restrictie endonuclease, bijvoorbeeld HindIII, op specifieke plaatsen opengeknipt waarbij lineair DNA ontstaat. Tussen de uiteinden daarvan wordt een stukje vreemd, niet-vectorieel DNA geplakt (door mengen van de tween lineaire plasmiden) onder ringsluiting door de twee lineaire plasmiden te mengen bij aanwezigheid van een polynucleotide ligase. Het vreemde, verkregen met hetzelfde enzym DNA kan afkomstig zijn van hogere organismen.

Zo kan bijvoorbeeld uit kikkers afkomstig DNA dat codeert voor ribosomaal RNA in pUC3 worden ingebouwd. Het circulaire recombinant plasmide bestaat dan uit pUC3 en een stukje kikker rDNA.

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 proteasen.

pUC3 ontleent zijn betekenis daaraan, dat het in staat is om als plasmide vector te functioneren in micro-organismen die voor industriële toepassingen van belang zijn, zoals Streptomyces. Kloneren van DNA uit Streptmyces in pUC3 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 bacteriën, zoals Bac-illus, daarin niet goed tot expressie komen. Evenzo komen genen uit Gram-negatieve bacteriën slecht of in het geheel niet tot expressie in Gram-positieve gastheren. Hiermee wordt het voordeel van een Gram-positief gastheervectorsysteem en daarmede de bruikbaarheid van pUC3 in een dergelijk systeem onderstreept.

Behalve bovengeschetste moeilijkheden met genexpressie kunnen zich ook moeilijkheden voordoen bij het kweken van het micro-organisme en bij de extractie en zuiverheid van het produkt. Aan deze moeilijkheden zou tegemoet kunnen worden gekomen door een plasmide vector bijvoorbeeld pUC3 in te brengen in een gastheer die het produkt vormt en in dat plasmide de genen voor het betreffende produkt 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 maar alleen de regulerende genen of genen die coderen voor de enzymen die de produktiesnelheid beheersen. Omdat pUC3 een streptomyceet plasmide is, leent het zich voor deze doeleinden bij uitstek in Streptomyces. Omdat pUC3 verder een plasmide uit een Gram-positief

micro-organisme is, kan het bovendien dienen als vector in een aantal andere micro-organismen zoals Bacillus en Arthrobacter.

Streptomyces sp.3022a NRRL 11441 kan in een waterif 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 proteïne. 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, pancreatisch verteerd caseïne, gistmeel, vaste destillateursbestanddelen, dierlijke peptonvloeistoffen en vlees- en beenderafval. 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 sporemetalen, zoals zink, magnesium, mangaan, kobalt en ijzer, toe te voegen.

Het geënte medium wordt bij een temperatuur van ongeveer 18-30° C en bij voorkeur 20-28° C geïncubeerd. Na ongeveer 2-5 dagen is de groei van het micro-organisme optimaal. Tijdens het kweken wordt het medium basisch en vormt zich chlooramphenicol.

Wanneer het kweken wordt uitgevoerd in grote vaten of tanks, verdient het de voorkeur om in plaats van de sporevorm de vegetatieve vorm van het micro-organisme te gebruiken voor het enten om een al te grote lag in de groei van het micro-organisme te vermijden en daarmee ondoelmatig gebruik van de apparatuur. Om een vegetatieve ent te vormen wordt een voedingsbouillon geënt met een passend gekozen hoeveelheid van een kweek in een vloeibare agar of een kweek in een schuine buis. De jonge en aktieve 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 plasmide pUC3 uit een biologisch zuivere cultuur van Streptomyces sp. 3022a NRRL 11441

Sporen van Streptomyces sp. 3022a NRRL 11441 werden geënt in 100 ml van een medium met de volgende samenstelling

bacto tryptone	0,05%
brer rabbit molasse	1,0 %
glycerol	1,0 %
Difco gistextrakt	0,25%
pH met 1 N NaOH op 7,2	ingesteld
kraanwater	1000 ml

Het medium was tevoren gesteriliseerd in een 500 ml Erlenmeyer kolf. Na het enten werd de kolfinhoud geIncubeerd bij 25° C gedurende ongeveer 36-48 uren in een Gump rotatieschudinrichting bij 250 omw./min..

De celsuspensie werd gebruikt om 40 kolven met glycerol-serine-lactaatmedium met een gehalte van 1% te enten. Het glycerol-serine-lactaatmedium was als volgt samengesteld:

glycerol	2%
60% natriumlactaat	2,8%
dl-serine	0,3%
natriumchloride	0,6%
Difco gistextrakt	0,025%
KH_2PO_4	0,14%
K_2HPO_4	0,2%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05%
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,0008%
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0006%
$ZnSO_4$	0,0012%
pH met 1 NaOH op 7,0	ingesteld

Na 3 dagen incuberen bij 28° C werden de cellen afgescheiden door centrifugeren bij lage snelheid zoals 10000 x g gedurende 10 min. bij 4° C gevolgd door afschenken van de bovenstaande vloeistof. Hierna werd het mycelium gesuspendeerd in 200 ml 25%-ige sucrose, met 50 ml Tris buffer op pH 8,0 ingesteld.

Na toevoegen van 40 ml van een 2 mg/ml oplossing van lysozym in TES buffer (0,03 M tris(hydroxymethyl)aminomethaan (Tris), 0,005 M EDTA en 0,05 M NaCl, pH 8,0) werd het mengsel 30 min. geIncubeerd bij 25° C waarbij van tijd tot tijd werd geroerd. Na toevoegen van 100 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0) werd het incuberen bij 25° C nog 30 min. voortgezet. Na afloop werd de celsuspensie gelyseerd door toevoegen van 320 ml van een lytisch mengsel van 1,0 gew./vol.% Brij-58 (een detergens van Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois), 0,4 gew./vol.% deoxycholzuur, 0,05 M Tris (pH 8,0) en 0,06 M EDTA, waarna 30 min. werd geïncubeerd bij 25° C. Het lysaat werd 30-60 min. geïncubeerd bij 50° C waarna 60 min. werd gecentrifugeerd in een Gumprotatieschudinrichting bij 10000 omw./min. onder gebruikmaking van een Sorvall centrifuge.

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 fluorescerende 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 werd geëxtraheerd door twee keer behandelen met 1/3 volume isopropanol waarna de waterige fase werd gedialyseerd tegen een mengsel van 10 ml Tris en 10 ml EDTA, pH 8,0, waarbij praktisch zuiver pUC3 werd verkregen.

Karakterisering van pUC3

De grootte van pUC3 werd bepaald door elektronenmicroscopie.

Restrictie endonuclease fragmentering en agarosegel electroforese

De gebruikte restrictie enzymen waren afkomstig van New England Biolabs.

Fragmentering van plasmide DNA werd uitgevoerd in een restrictiebuffer bestaande uit 10 mM Tris·HCl, pH 7,4; 5mM

$MgCl_2$; 1 mM DTT voor Ava I, HphI, Mbo II, Pvu II, Hae II, Kpn I, Hinc II, Hpa I en Bgl II. Dezelfde buffer waaraan toegevoegd 50 mM NaCl werd gebruikt voor Bam H-I, Hinf I, Sal I, Xba I, Bgl I, EcoRI, Xho, Hind III en Pst I. Sma I fragmenteringsmengsels bevatten 15 mM Tris.HCl, pH 9,0; 15 mM KCl; 6 mM $mgCl_2$ (Post, L.E., Arfsten, A.E., Reusser, F. en Nomura, M, 1978; DNA sequences of promoter regions for the str en spc ribomosal protein operons in E. coli, Cell 15, 215 - 229).

De fragmenteringsmengsels werden geanalyseerd in 1%-ige agarose gelen bereid volgens Shinnick et al. (Shinnick, T.M., Lund, E., Smithies, O. en Blattner, F.R., 1975; Hybridization of labeled RNA tot DNA in agarose gels, Nucl.Acids Res. 2, 1911 - 1229).

Als referentie voor het molekuulgewicht werd Hind III gefragmenteerd λ DNA gebruikt (Murray, K. en Murray, N.E. 1975: Phage Lambda Receptor Chromosomes for DNA Fragments made with Restriction Endonuclease III of Haemophilus influenzae and Restriction Endonuclease I of Escherichia coli, J. Mol. Biol. 98, 551-564).

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

CONCLUSIES

1. Plasmide DNA met het kenmerk, dat plasmide DNA met de code pUC3 in zuivere of praktisch zuivere toestand een molekuulgewicht bezit van ongeveer 20 x 10^6 dalton en een restrictie endonuclease 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 pUC3 zoals omschreven in conclusie 1 wordt geïsoleerd uit Streptomyces sp. 3022a NRRL 11441, waarbij

(a) het micro-organisme wordt gekweekt tot het mycelium voldoende is gegroeid;

(b) de cultuur wordt geoogst;

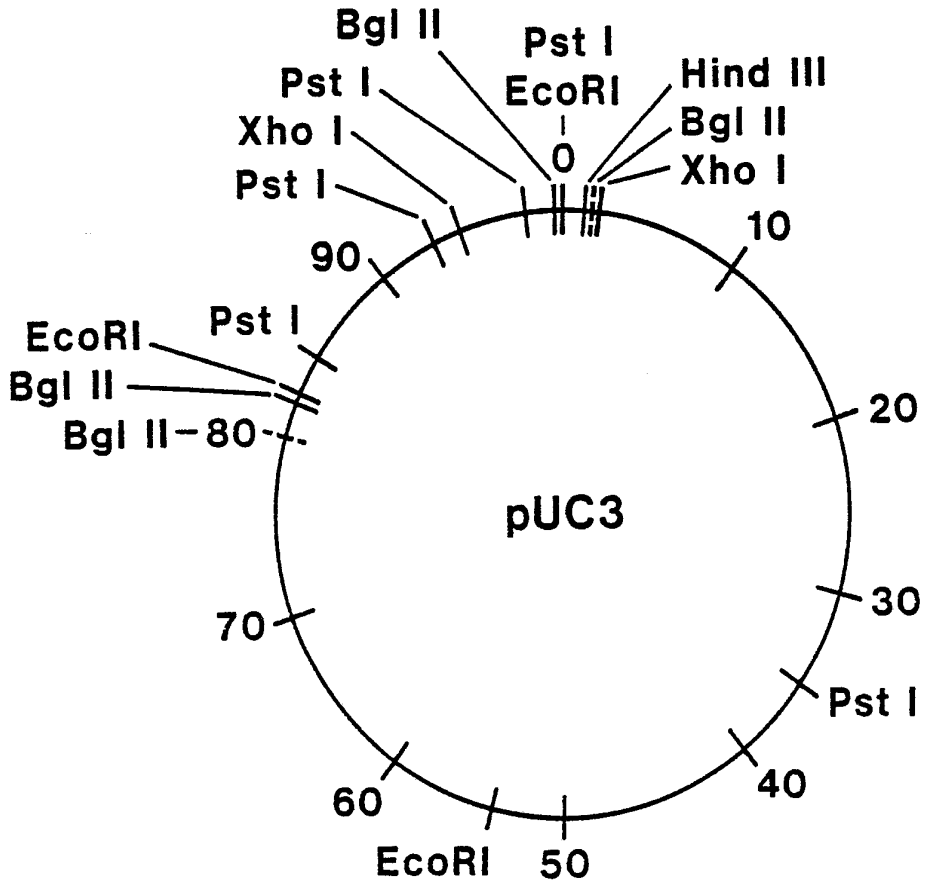
(c) het geoogste mycelium wordt gelyseerd; en

(d) uit het lysaat zuiver of praktisch zuiver pUC3 wordt geïsoleerd.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het kweken ongeveer 36 - 48 uren wordt uitgevoerd bij een temperatuur van ongeveer 28°C.

4. Plasmide pUC3 verkrijgbaar met de werkwijze zoals beschreven in de beschrijving en het voorbeeld.

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



8001464

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