

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 289 561 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/65

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 329 068 5	(22)	31.05.89	(44)	02.05.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72)	Schröder, Ralph, Dipl.-Biol.; Dobrowolski, Peter, Dr. rer. nat., DE
(73)	Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, AG Patentwesen, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE
(74)	siehe (73)

(54)	Verfahren zur Herstellung neuer Plasmide mit effektiven Promotoren für die heterologe Genexpression in gramnegativen Bakterien
------	---

(55) gramnegative Bakterien; Gentechnik; Plasmide; Phagen; Promotoren

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Plasmide mit effektiven Promotoren für die heterologe Genexpression in Stämmen gramnegativen Bakterien, vorzugsweise in Produzentenstämmen des E. coli- oder des A. methanolicus-Systems. Es wurden promotortragende Fragmente aus der DNS des Phagen AcM 1 von A. methanolicus in ein Basisplasmid [pRS 201] derart eingefügt, so daß die gesuchten promotorenhaltenden rekombinanten Plasmide durch Selektion auf das aktivierte Strukturgen [Streptomycin-Resistenz] des Basisplasmids ermöglicht wurde. Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden die Plasmide der pRSAC-Serie, die ein breites Wirtsspektrum besitzen, zur Verfügung gestellt. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Gentechnik und andere Bereiche der Biotechnologie.

ISSN 0433-6461

12 Seiten

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel neue Plasmide mit effektiven Promotoren für die Konstruktion von Expressionsvektoren für *Acetobacter methanolicus* und/oder anderer gramnegativer Bakterien bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein gentechnisches Verfahren zur Bereitstellung von neuen Plasmiden mit starken Promotoren des Phagen Acm 1 zu entwickeln, durch deren Nutzung eine effektive Initiation der Transkription eines stromabwärts eingebauten Gens in *E. coli* oder *A. methanolicus* oder in anderen gramnegativen Bakterien erreicht wird.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe wie folgt gelöst:

In einem ersten Schritt werden parallel

a) ein neu konstruiertes mit einer Restriktase linearisiertes Basisplasmid, das sich durch ein breites Wirtsspektrum für gramnegative Bakterien auszeichnet und ein inaktives Strukturgen enthält, und

b) ein bzw. mehrere promotortragende Fragmente aus der DNS des Phagen Acm 1 für die Ligation vorbereitet.

Nach Zusammenführung beider Komponenten im Verhältnis a:b = 1:5 erfolgt die Ligation mit DNS-Ligase und anschließend eine Transformation des Ligationsgemisches in *E. coli*, wobei eine Identifikation der rekombinanten, promotorenhaltenden Plasmide durch Selektion auf das aktivierte Strukturgen erfolgt. Im nächsten Schritt werden die rekombinanten Plasmide selektiert, bei denen die Aktivität des Strukturgens besonders effizient ist. In diese Plasmide (pRSAC-Serie) wird zur besseren Beurteilung der Promotorstärke ein weiteres promotorloses Strukturgen, dessen Expression relativ leicht mittels eines spektrophotometrischen Tests verfolgt werden kann, stromabwärts von den klonierten Phagenpromotoren inseriert. Die spezifische Aktivität dieses Genproduktes wird mit denen der durch den p_R - und *tac*-Promotor in analoger Plasmidkonstruktion verursachten spezifischen Aktivität in *E. coli* und *A. methanolicus* verglichen.

Für die Umsetzung dieses Grundverfahrens wird als Basisplasmid der Promotor-Test-Vektor pRS 201, der durch gerichtete Insertion des Kanamycin-Resistenzgens aus dem Plasmid pUC 4K (Vieira und Messing, 1982, *Gene* 19, 259–268) in mit PstI vollständig gespaltene pRS 3-DNS (Schröder et al., 1989, *Acta Biotechnol.* 9, 219–225) gewonnen wird, verwendet. Dieses Plasmid enthält 8 verschiedene Erkennungsorte für Restriktasen vor dem (stromaufwärts) stummen, promotorlosen Strukturgen *aph* (Streptomycin-Resistenzgen), wobei der BamHI-Erkennungsort für die anschließende Promotorklonierung genutzt wird. Das Plasmid pRS 201 wird in an sich bekannten molekularbiologischen Schritten aus der Übernachtskultur eines *E. coli*-Stammes isoliert, gereinigt und mit der Restriktase BamHI linearisiert. Parallel wird durch Standardmethoden (Maniatis et al., 1982, „Molecular cloning. A laboratory manual.“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 17–85) die DNS des Phagen Acm 1, der im Felix d' Herelle Reference Center for Bacterial Viruses, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Quebec, QC, G1K7P4, Canada hinterlegt wurde, isoliert, gereinigt und mit der Restriktase Sau3A partiell geschnitten. Da dieses Enzym DNS-Fragmente erzeugt, die mit BamHI-gespaltener DNS kompatibel sind, können nach Inaktivierung der Restriktasen beide Ansätze im obengenannten Verhältnis gemischt und mit DNS-Ligase behandelt werden. Anschließend erfolgt die Transformation dieses Ligationsgemisches in *E. coli* C6000 (Chistoserdov et al., 1987, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 8, 36–41), wobei die Selektionsplatten Streptomycin enthalten und somit eine Selektion auf das aktivierte Strukturgen des Basisplasmids pRS 201 erfolgt. Die auf diesen Agarplatten wachsenden *E. coli*-Transformanten enthalten die neuen rekombinanten Plasmide, die im BamHI/Sau3A-Erkennungsort Acm1-DNS-Fragmente mit Promotoren in der richtigen Orientierung zum Streptomycin-Resistenzgen enthalten. Diese neuen Plasmide werden mit pRSAC und einer Seriennummer bezeichnet. Die Streptomycin-resistenten Transformanten werden auf LA-Medium mit $2000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Streptomycin überstempelt. Dabei werden vier Bakterienkolonien identifiziert, die besonders gut unter diesen Bedingungen wachsen können. Es handelt sich hierbei um die Transformanten, die die Plasmide pRSAC 109, pRSAC 115, pRSAC 117 und pRSAC 119 enthalten. Von diesen Transformanten wird mit den an sich bekannten Standardmethoden die Plasmid-DNS isoliert, gereinigt und somit für weitere molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Biologisch reine Kulturen von *E. coli*-Stämmen, die die in dieser technischen Lehre beschriebenen neuen Plasmide enthalten, sind in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW der DDR, Beutenbergstraße 11, Jena, 6900, unter den Registriernummern

IMET 11336 für *E. coli* C6000 (pRSAC 109),
 IMET 11337 für *E. coli* C6000 (pRSAC 115),
 IMET 11338 für *E. coli* C6000 (pRSAC 117) und
 IMET 11339 für *E. coli* C6000 (pRSAC 119)

hinterlegt worden.

Die elektrophoretisch ermittelten Phagen-Insertgrößen sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Für die bessere Beurteilung der Promotorstärke der klonierten Phagenpromotoren wird ein weiteres promotorloses Strukturgen, das für Chloramphenicol-Acetyltransferase (*E.C.2.3.1.28.*) kodierende *cat*-Gen (ca. 780bp), stromabwärts von den Acm 1-Promotoren der pRSAC-Plasmide inseriert. Ausgangspunkt hierfür ist das Plasmid pCM 1 (Close und Rodriguez, 1982, *Gene* 20, 305–316),

kiert enthält. In den weiteren molekularbiologischen Schritten wird dieses *cat*-Gen so modifiziert, daß es von 6 verschiedenen Erkennungsorten für Restriktasen symmetrisch flankiert wird und anschließend mit einer Restriktase aus dem resultierenden Plasmid herausgelöst werden kann, die das *cat*-DNS-Fragment mit solchen Enden ausstattet, die einen Einbau dieses modifizierten Gens in einen stromabwärts von den Acm 1-Promotoren der pRSAC-Plasmide eines im Polylinker befindlichen Erkennungsortes für Restriktasen erlaubt. Hierzu wird das Plasmid pRS3A CAT konstruiert. Aus diesem Plasmid wird das *cat*-Gen

durch KpnI-Restriktion gewonnen und nacheinander in vier getrennten Ansätzen mit KpnI linearisierten pRSAC-Plasmiden ligiert.

Bei der sich anschließenden Transformation des Ligationsgemisches in *E. coli*-Bakterien können die gesuchten Bakterien-Klone mit den rekombinanten Plasmiden durch Ausspateln des Transformationsgemisches auf Chloramphenicol-haltigen LA-Medium identifiziert werden. Die gesuchten, mit pRSAC 109 CAT, pRSAC 115 CAT, pRSAC 117 CAT und pRSAC 119 CAT bezeichneten, Plasmide enthalten stromabwärts von den klonierten *Acm 1*-Promotoren das promotorlose *cat*-Gen in gewünschter Orientierung.

In Analogie zur Konstruktion der zuletzt genannten Plasmide werden die Plasmide pRS 201 p_RCAT und pRS 201_{lac} CAT konstruiert, die den p_R- bzw. den *tac*-Promotor stromaufwärts von dem promotorlosen *cat*-Gen in Verbindung mit dem RSF 1010 Replikon enthalten. Die Plasmide pRS 201 p_R CAT und pRS 201_{lac} CAT sowie die das *cat*-Gen enthaltenden pRSAC-Plasmide werden mit Hilfe des Plasmids pRK 2013 (Figurski und Helinski, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1648-1652) konjugativ in *Acetobacter methanolicus* (IMET B 346) übertragen. Im Fall des Plasmids pRS 201 p_R CAT wird hierbei eine Variante verwendet, bei der der thermolabile Repressor des *cl857*-Gens bereits bei 30°C inaktiv ist, d. h. die Expression des *cat*-Gens konstitutiv erfolgt.

Anschließend werden in an sich bekannter Weise die das Plasmid pRSAC 109 CAT bzw. pRSAC 115 CAT bzw. pRSAC 117 CAT bzw. pRSAC 119 CAT bzw. pRS 201 p_R CAT bzw. pRS 201_{lac} CAT enthaltenden *E. coli*- bzw. *A. methanolicus*-Bakterien bis zur späten log-Phase *coli*- bzw. *A. methanolicus*-Bakterien bis zur späten log-Phase bei 30°C kultiviert, durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und durch Ultraschall-Behandlung lysiert. Nach Zentrifugation der lysierten Bakterienproben erfolgt die Bestimmung der spezifischen CAT-Aktivität (Shaw, 1975, Meth. Enzymol. 43, 737-755) im Überstand der Proben. Die gemittelten spezifischen CAT-Aktivitäten von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind in Tab. 2 dargestellt.

Ausführungsbeispiel

A Konstruktion des Plasmids pRS 201

Die Konstruktion des Promotor-Test-Vektors pRS 201 erfolgt auf der Basis der Plasmide pRS 3 und pUC 4 K. Für die Isolation beider Plasmide werden der *E. coli*-Stamm C 6000 (pRS 3) und C 6000 (pUC 4 K) eingesetzt. Die Isolation der Plasmid-DNS erfolgt in an sich bekannter Weise (Maniatis et al., „Molecular cloning. A laboratory manual.“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 86-93) aus den Übernachtskulturen der genannten Stämme. Die isolierte Plasmid-DNS wird in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA) bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wird die DNS beider Plasmide in getrennten Ansätzen mit der Restriktionsendonuklease Pst I unter den vom Hersteller (Boehringer Mannheim) angegebenen Bedingungen vollständig gespalten. Die Korrektheit der Restriktion wird mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach anschließender 5minütiger Inkubation der Restriktionsgemische bei 65°C wird die gespaltene Plasmid-DNS durch Zugabe von 2 Volumenanteilen 96%igem Ethanol und 2stündiger Inkubation bei -20°C ausgefällt, sedimentiert, getrocknet und in Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTE; 1 mM ATP, 1 mM Spermidin) aufgenommen. Für die Ligation werden in an sich bekannter Weise 1 µg Pst I-behandelte pUC 4 K-Plasmid-DNS vermischt und mit 2 Einheiten DNS-Ligase versetzt. Die Ligationsreaktion findet in einem Volumen von 20 µl bei 14°C in einem Zeitraum von 15 Stunden statt. 10 µl des Ligationsgemisches werden für die Transformation von *E. coli* C 6000 eingesetzt. Die Transformation erfolgt in an sich bekannter Weise (Maniatis et al., 1982, „Molecular cloning. A laboratory manual.“, Cold Spring Harbor, New York, 249-253). Die Selektion der Transformanten erfolgt auf Kanamycin-haltigen (50 µg · ml⁻¹) L-Agarplatten. Anschließend werden die erhaltenen Klone auf ihre Antibiotika-Resistenzen (Ampicillin-, Kanamycin-, Streptomycin- und Sulfonamidresistenz) untersucht. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wird ein Klon identifiziert, der nur Resistenz gegen Kanamycin aufweist und ein Plasmid mit der erwarteten Molekülgröße von 9,1 kb enthält. Von diesem Klon wird die isolierte Plasmid-DNS mittels Restriktionsanalyse auf die Korrektheit der Konstruktion (Abb. 1) des gesuchten Plasmids untersucht. Dieses Plasmid wird mit pRS 201 bezeichnet.

B Isolation von *Acm 1*-DNS

Zur Gewinnung von *Acm 1*-Phagen-DNS wird eine Submerskultur des Stammes *A. methanolicus* (IMET 10945) in der logarithmischen Wachstumsphase (nach 15 Stunden Kultivierung bei 30°C) mit dem Phagen *Acm 1* mit einer Multiplizität von MOI = 0,1 infiziert und weitere 10 Stunden bei 30°C kultiviert. Anschließend wird durch Zentrifugation und Filtration über eine Glasfritte G 5 das Rohlysat erhalten. Die DNS des Rohlysates wird analog zur Reinigung der Lambda-DNS in an sich bekannter Weise im Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Dichtegradienten gereinigt (Maniatis et al., „Molecular cloning. A laboratory manual.“, Cold Spring Harbor, New York, 80-85) und in TE-Puffer resuspendiert (Konzentration = 1 µg · µl⁻¹) zur Verfügung gestellt.

C Insertion von *Acm 1*-DNS-Fragmenten in pRS 201

Die pRS 201-Plasmid-DNS wird aus dem *E. coli*-Stamm C 6000 (pRS 201) in an sich bekannter Weise aus der Übernachtskultur des genannten Stammes isoliert. Zur Reinigung der Plasmid-DNS von kontaminierender chromosomaler DNS wird eine Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Maniatis et al., „Molecular cloning. A laboratory manual.“, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 93-94). Die gereinigte DNS wird in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

1 µg pRS 201-DNS wird mit dem Restriktionsenzym BamHI unter den vom Hersteller (Boehringer Mannheim) angegebenen Bedingungen an der unikalen BamHI-Schnittstelle linearisiert. Parallel dazu werden in an sich bekannter Weise 8 µg *Acm 1*-DNS mit Sau 3A partiell verdaut. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme werden die jeweiligen Ansätze 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wird jeweils durch Zugabe von 2 Volumenteilen 96%igem Ethanol und zweistündiger Inkubation bei -20°C die DNS ausgefällt, sedimentiert, getrocknet und im Originalvolumen mit Ligationspuffer aufgenommen. Linearisierte Plasmid-DNS und fragmentierte *Acm 1*-DNS werden im Verhältnis 1:5 gemischt und mit DNS-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgt bei 14°C in einem Zeitraum von 16 Stunden. Das Ligationsgemisch wird zur Transformation von *E. coli* C 6000 eingesetzt.

D Selektion Acm 1-promotorenhaltener Plasmide (pRSAC)

Transformanten mit rekombinanten Plasmiden, die promotortragende DNS-Fragmente aus der Acm 1-DNS enthalten, werden auf L-Agarplatten mit $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Streptomycin selektiert. Streptomycinresistente E. coli C6000-Transformanten werden isoliert und hinsichtlich der Höhe ihrer Streptomycinresistenz getestet. Nach Überstempeln der Transformanten auf L-Agarplatten mit $2000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Streptomycin werden vier Klone identifiziert, die besonders gut unter diesen Bedingungen wachsen können. Von diesen Klonen wird mit den oben genannten Standardmethoden die Plasmid-DNS isoliert, gereinigt und in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt. Die Plasmide der vier genannten Klone werden mit pRSAC 109, pRSAC 115, pRSAC 117 und pRSAC 119 bezeichnet.

E Ermittlung der Größe der klonierten DNS-Fragmente

Aus den Zellen der Übernachtskulturen der betreffenden Transformanten werden die Plasmide mit den unter C genannten Standardmethoden isoliert, gereinigt und in TE-Puffer aufgenommen. In vier getrennten Ansätzen wird jeweils $1 \mu\text{g}$ der pRSAC 109- bzw. pRSAC 115- bzw. pRSAC 117- bzw. pRSAC 119-DNS mit Sma I unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen verdaut und auf 1%igen Agarosegelen in an sich bekannter Weise elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen werden Pst I-Fragmente der DNS des Phagen Lambda als Molekulargewichtsstandards verwendet. Von den graphisch ermittelten Sma I-promotorenhaltenden DNS-Fragmentgrößen (jeweils kleinere DNS-Bande im Agarosegel) wird jeweils der Anteil des Kanamycin-Gens subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

F Konstruktion des Plasmids pRS 201_{pa}

Die Plasmide pRS 201 und pCQV 2 (Queen, 1983, J. Mol. Appl. Genet. 2, 1-10) werden wie im Abschnitt C aus den Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme isoliert, gereinigt und in TE-Puffer resuspendiert. Anschließend werden jeweils $1 \mu\text{g}$ der pCQV 2- bzw. der pRS 201-DNS nacheinander mit jeweils 2 Einheiten BamHI und EcoRI vollständig verdaut und die Vollständigkeit der Restriktion mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Nach 5minütiger Inkubation der Restriktionsansätze bei 65°C wird die DNS jeweils durch Zugabe von zwei Volumenanteilen 96%igem Ethanol und zweistündiger Inkubation bei -20°C ausgefällt, sedimentiert, getrocknet und mit Ligationspuffer aufgenommen. Beide so behandelten DNS-Ansätze werden im Verhältnis 1:1 gemischt und in an sich bekannter Weise mit DNS-Ligase ligiert. Die im Ligationsgemisch enthaltene DNS wird mittels Transformation in den Stamm E. coli C6000 überführt. Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation erfolgen in an sich bekannter Weise. Die Selektion plasmidhaltiger Klone erfolgt auf L-Agarplatten mit Kanamycin ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) und Streptomycin ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) bei 30°C . Anschließend werden die Kanamycin/Streptomycinresistenten Klone durch Überstempeln auf L-Agarplatten mit Ampicillin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) auf die Abwesenheit der durch das Plasmid pCQV 2 kodierten Ampicillinresistenz überprüft.

Im Ergebnis wird mindestens ein Ampicillinsensitiver Klon identifiziert. Von diesem Klon wird DNS in der schon mehrfach dargestellten Weise gewonnen und mittels Restriktionsanalyse wird die Korrektheit der gentechnischen Konstruktion überprüft. Das rekombinante Plasmid, das nach elektrophoretischer Auftrennung das erwartete Spaltmuster aufweist, wird mit pRS 201_{pa} bezeichnet (Abb. 2).

G Konstruktion des Plasmids pRS 201_{lac}

Die Plasmide pRS 201 und pDR 540 (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden) werden aus den Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterienstämme isoliert, gereinigt und in TE-Puffer resuspendiert. Die DNS beider Plasmide wird analog der unter F beschriebenen Weise mit BamHI linearisiert, gemischt, ligiert und transformiert. Die Selektion plasmidhaltiger Klone erfolgt jedoch auf L-Agarplatten mit Streptomycin ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) bei 37°C . Nach Überstempeln der erhaltenen Klone auf L-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika werden Klone, die gegen Ampicillin, Kanamycin und Streptomycin resistent sind, identifiziert. Von diesen Klonen wird analog zur Konstruktion von pRS 201_{pa} die Plasmid-DNS isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Im Ergebnis der Untersuchungen wird das Plasmid pRS 201_{lac-galK} (Abb. 2) isoliert. Die DNS dieses Plasmids wird mit HindIII gespalten, religiert und in E. coli C6000 transformiert. Bei der anschließenden Selektion werden nur Klone isoliert, die lediglich Streptomycinresistenz aufweisen. Ein Klon, der ein Plasmid mit dem erwarteten Spaltmuster enthält, wird isoliert. Dieses Plasmid wird mit pRS 201_{lac} bezeichnet (Abb. 2).

H Konstruktion des Plasmids pRS 3C

Die Plasmide pCM 1 und pUC 4K werden analog wie für pRS 201 beschrieben isoliert, gereinigt und in TE-Puffer resuspendiert. Anschließend werden beide Plasmide mit Sall vollständig geschnitten und nach Inaktivierung der Restriktionsendonucleasen erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der gespaltenen Plasmid-DNS in einem 1%igen Agarosegel. Von der gespaltenen pUC 4K-DNS wird das $2,7 \text{ kb}$ große Fragment und von der verdauten pCM 1-DNS das $0,78 \text{ kb}$ große Fragment per Elektroelution (Maniatis et al., 1982, „Molecular cloning. A laboratory manual.“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 164-166) isoliert. Die auf diese Weise isolierte DNS wird jeweils in $5 \mu\text{l}$ Ligationspuffer aufgenommen. Diese DNS wird anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt und in an sich bekannter Weise mit DNS-Ligase behandelt. Bei der sich anschließenden Transformation des Ligationsgemisches in E. coli C6000 erfolgt die Selektion plasmidhaltiger Klone auf L-Agarplatten, die gleichzeitig Ampicillin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) und Chloramphenicol ($30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) enthalten. Es wird mindestens ein Klon identifiziert, der ein Plasmid enthält, das nach durchgeführter Restriktionsanalyse das gewünschte Spaltmuster aufweist. Dieses Plasmid wird mit pRS 3C bezeichnet (Abb. 3).

I Konstruktion des Plasmids pRS 3A CAT

Die DNS der Plasmide pRS 3C und pRS 3A (enthält die pUC 19-DNS im Vergleich zu pRS 3 in entgegengesetzter Orientierung) wird nach den oben beschriebenen Methoden aus den Übernachtskulturen der plasmidtragenden Bakterienstämme isoliert, gereinigt und in TE-Puffer aufgenommen. $2 \mu\text{g}$ der pRS 3C-DNS werden mit BamHI verdaut und nach Inaktivierung der Restriktase wird der Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt. Das $0,78 \text{ kb}$ große cat-DNS-Fragment wird nach der im Abschnitt H angegebenen Methode aus dem Agarosegel eluiert. Parallel hierzu wird $1 \mu\text{g}$ der pRS 3A-DNS mit BamHI vollständig gespalten.

Das cat-Gen enthaltende DNS-Fragment wird mit der BamHI-verdauten pRS 3A-DNS vermischt und in an sich bekannter Weise mit DNS-Ligase behandelt. Das Ligat wird anschließend mit XbaI behandelt, wodurch die Selektion von Plasmidvarianten, die das Polylinkerfragment BamHI-XbaI-Sall-XbaI-BamHI des Plasmids pRS3A enthalten, stark reduziert wird. Die Transformation erfolgt in *E. coli* C6000, wobei Klone selektiert werden, die resistent gegen Kanamycin, Ampicillin und Sulfonamid sind. Von solchen Klonen wird die Plasmid-DNS isoliert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Im Ergebnis wird ein Plasmid identifiziert, das das gewünschte Spaltmuster aufweist. Dieses Plasmid wird mit pRS3A CAT bezeichnet (Abb. 4).

J Insertion des cat-Gens stromabwärts von den klonierten AcM 1-Phagen-Promotoren

Die nach den üblichen Methoden gewonnene pRS 3A CAT-DNS wird mit KpnI vollständig geschnitten und das cat-Gen enthaltende Fragment wird per Elektroelution isoliert. In vier getrennten Ansätzen wird jeweils 1 µg der auf diese Weise hergestellten cat-DNS mit 1 µg der durch KpnI-Restriktion linearisierten pRSAC-DNS gemischt, ligiert und in *E. coli* C6000 transformiert. Die Selektion plasmidhaltiger Klone erfolgt auf L-Agarplatten mit Chloramphenicol (50 µg · ml⁻¹). Im Ergebnis der anschließend in an sich bekannter Weise durchgeführten Untersuchungen werden die Plasmide mit gewünschtem Spaltmuster identifiziert und isoliert. Die Plasmide werden mit pRSAC 109 CAT, pRSAC 115 CAT, pRSAC 117 CAT und pRSAC 119 CAT bezeichnet (Abb. 5a).

K Insertion des cat-Gens in die Plasmide pRS201_{p_R} und pRS201_{tac}

Die Plasmide pRS201_{p_R}, pRS201_{tac} und pRS3C werden in der bereits mehrfach dargestellten Weise isoliert und in TE-Puffer aufgenommen. In beiden Fällen wird der BamHI-Erkennungsort zum Einbau des cat-Gens genutzt. Die DNS der drei Plasmide wird in der bereits dargestellten Weise mit BamHI vollständig gespalten. Nach Inaktivierung der Restriktionsendonucleasen und Kontrolle der Vollständigkeit der Restriktion wird in zwei getrennten Ansätzen jeweils 1 µg linearisierte pRS201_{p_R}-DNS mit 1 µg gespaltenen pRS3C-DNS bzw. 1 µg linearisierte pRS201_{tac}-DNS mit 1 µg pRS3C-DNS in der schon dargestellten Weise miteinander ligiert. Beide Ligationsgemische werden in der üblichen Weise zur Transformation von *E. coli* C6000 eingesetzt. Die Selektion von Transformanten mit rekombinanten Plasmiden, die das cat-Gen in gewünschter Orientierung stromabwärts vom p_R-Promotor enthalten, erfolgt auf L-Agarplatten mit Kanamycin (100 µg · ml⁻¹). Durch nachfolgende Replicaplatting werden Klone identifiziert, die schon bei 30°C resistent gegen Chloramphenicol sind, d. h. bei denen die vom p_R-Promotor verursachte Initiation der Transkription konstitutiv erfolgt. Die Selektion der Transformanten mit rekombinanten Plasmiden, die das cat-Gen in gewünschter Orientierung stromabwärts vom tac-Promotor enthalten, erfolgt auf L-Agarplatten mit Streptomycin (50 µg · ml⁻¹) und Chloramphenicol (50 µg · ml⁻¹) bei 30°C. Die rekombinanten Plasmide, die nach Restriktion und elektrophoretischer Auftrennung das erwartete Spaltmuster aufwiesen, werden mit pRS201_{p_R} CAT bzw. mit pRS201_{tac} CAT bezeichnet (Abb. 5b, 5c).

L Konjugativer Transfer der Plasmide pRSAC 109 CAT, pRSAC 115 CAT, pRSAC 117 CAT, pRSAC 119 CAT, pRS201_{p_R} CAT und pRS201_{tac} CAT in *Acetobacter methanolicus* (IMET B346)

Die konjugative Übertragung der Plasmide erfolgt auf der Oberfläche fester Nährmedien, vorzugsweise Vollnähragarplatten (Uhlig et al., 1986, Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 317–322) mit einem pH-Wert von 6,0. Exponentiell wachsende *E. coli*-Kulturen mit den zu übertragenden Plasmiden sowie eine *E. coli*-Kultur mit dem Helferplasmid pRK2013 und eine Bakterienkultur mit dem Rezipientenstamm *A. methanolicus* (IMET B346) werden sedimentiert und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Anschließend werden in getrennten Ansätzen jeweils der entsprechende Donorstamm mit dem Helfer- und Rezipientenstamm im Verhältnis 1:1:6 gemischt, auf Vollnähragarplatten (pH 6,0) ausgespatelt und für 30 Stunden bei 30°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienzellen werden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und auf Selektionsplatten mit Standardagar (Uhlig et al., 1986, Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 317–322) unter Zusatz von Chloramphenicol (300 µg · ml⁻¹) ausgespatelt und für 5–7 Tage bei 30°C inkubiert. Von diesen Agarplatten werden Einzelkolonien abgenommen, die anschließend in an sich bekannter Weise auf das Vorhandensein der zu übertragenden Plasmide überprüft werden.

M Bestimmung der spezifischen Aktivität der Chloramphenicol Acetyltransferase in Bakterienlysaten

Bakterienkulturen mit den entsprechenden Plasmiden werden in der späten logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, mit DTT-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 30 µM Dithiothreitol) gewaschen, mit Ultraschall lysiert, und durch Zentrifugation erfolgt die Abtrennung der Zellbruchstücke. Der Überstand (Rohextrakt) wird bis zur Enzymbestimmung im Eisbad gelagert. In die Referenz- und Probenküvette eines geeigneten Spektrophotometers (z. B. SPECORD UV VIS, Carl Zeiss Jena) wird das Reaktionsgemisch (100 mM Tris-HCl, pH 7,8; 0,4 mg · ml⁻¹ DTNB, 0,1 mM Acetyl-CoA) einpipettiert. Zur Bestimmung der Extinktion bei 412 nm wird das Spektrophotometer entsprechend vorbereitet (Justierung Ex₄₁₂ auf 0,0). Nachfolgend wird Rohextrakt in die Probenküvette einpipettiert und sofort gemischt. Nach 3 Minuten wird Chloramphenicol zum Start der Reaktion hinzugegeben (Endkonzentration 0,1 mM) und die Zunahme der Extinktion wird für 3–5 Minuten verfolgt. Anschließend erfolgt die Bestimmung des Proteingehaltes vom Rohextrakt der Probe nach einer der üblichen Standardmethoden (z. B. Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248–254). Aus den erhaltenen Werten wird die spezifische Aktivität der Chloramphenicol Acetyltransferase errechnet (Shaw, 1975, Methods Enzymol. 43, 737–755).

Tabelle 1

Plasmid	Größe der inserierten Phagen-DNS
pRSAC 109	1,71 kb
pRSAC 115	0,96 kb
pRSAC 117	0,59 kb
pRSAC 119	0,95 kb

Tabelle 2

Plasmid	Spezifische CAT-Aktivität in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	
	in <i>E. coli</i> C 6000	in <i>A. methanolicus</i> IMET B 346
pRSAC 109 CAT	11504,5	807,8
pRSAC 115 CAT	13074,8	751,9
pRSAC 117 CAT	6990,8	6418,6
pRSAC 119 CAT	19421,0	4436,2
pRS 201 _{lac} CAT	5123,8	943,5
pRS 201 p _R CAT	6725,5	4045,5

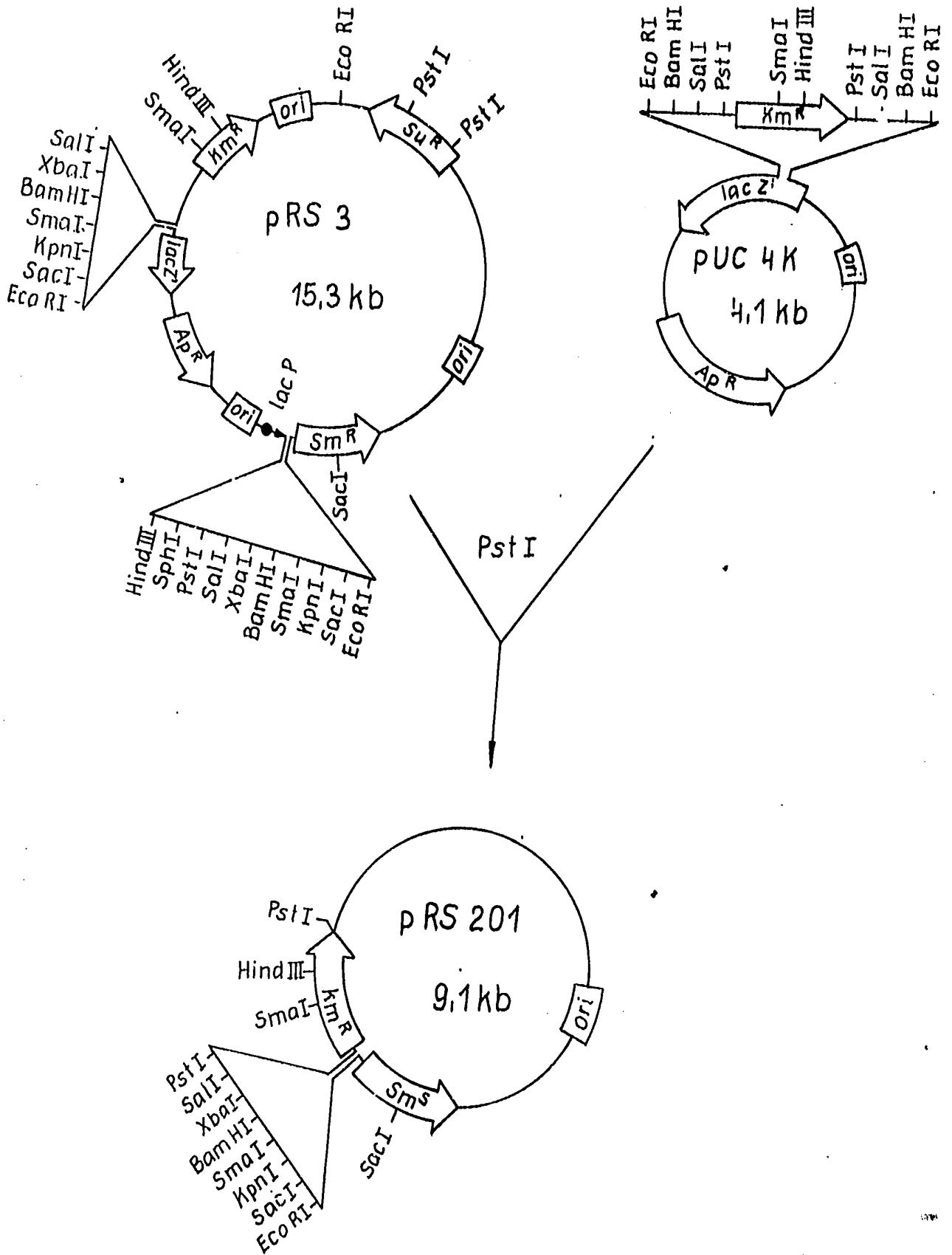


Abb. 1

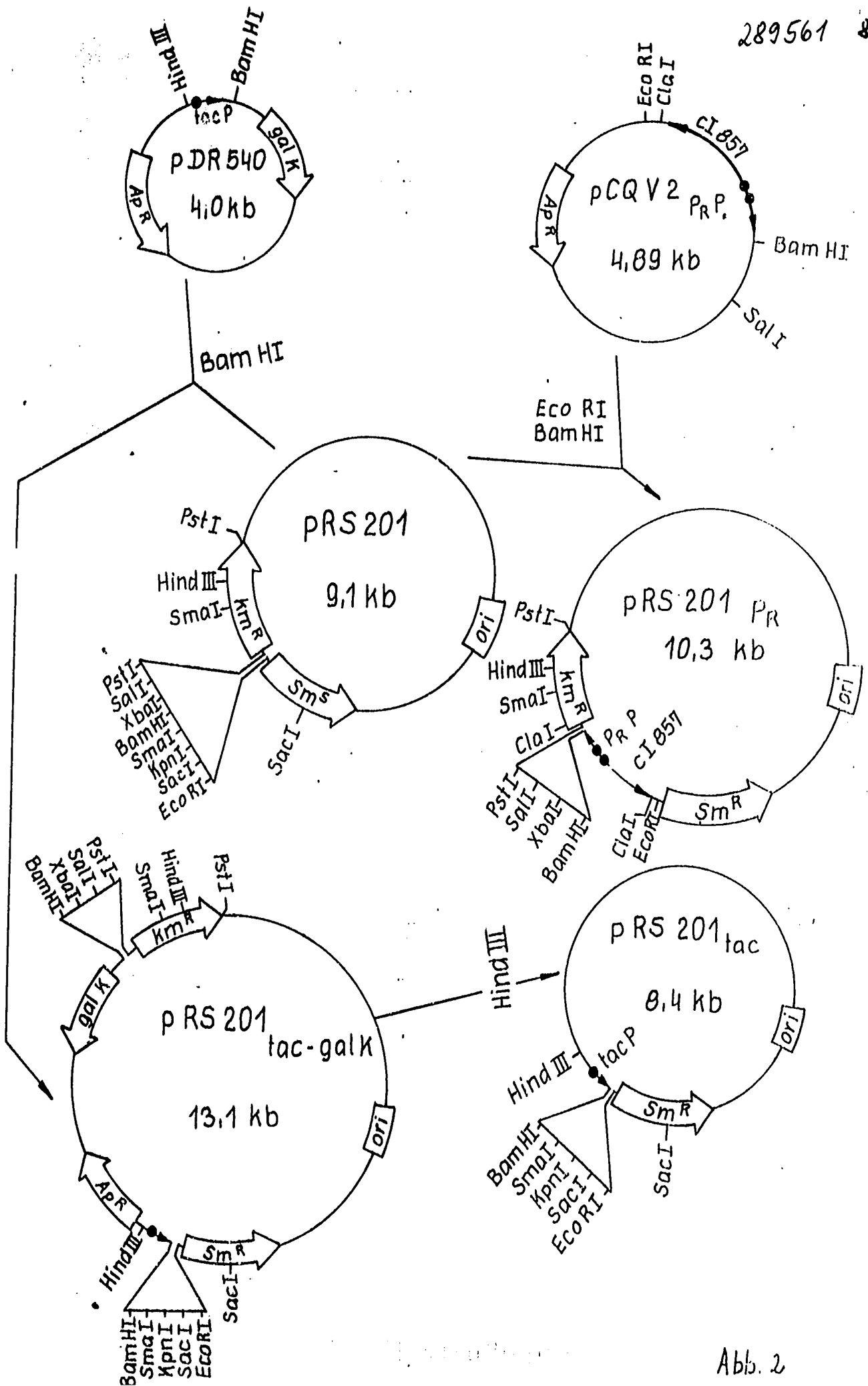


Abb. 2

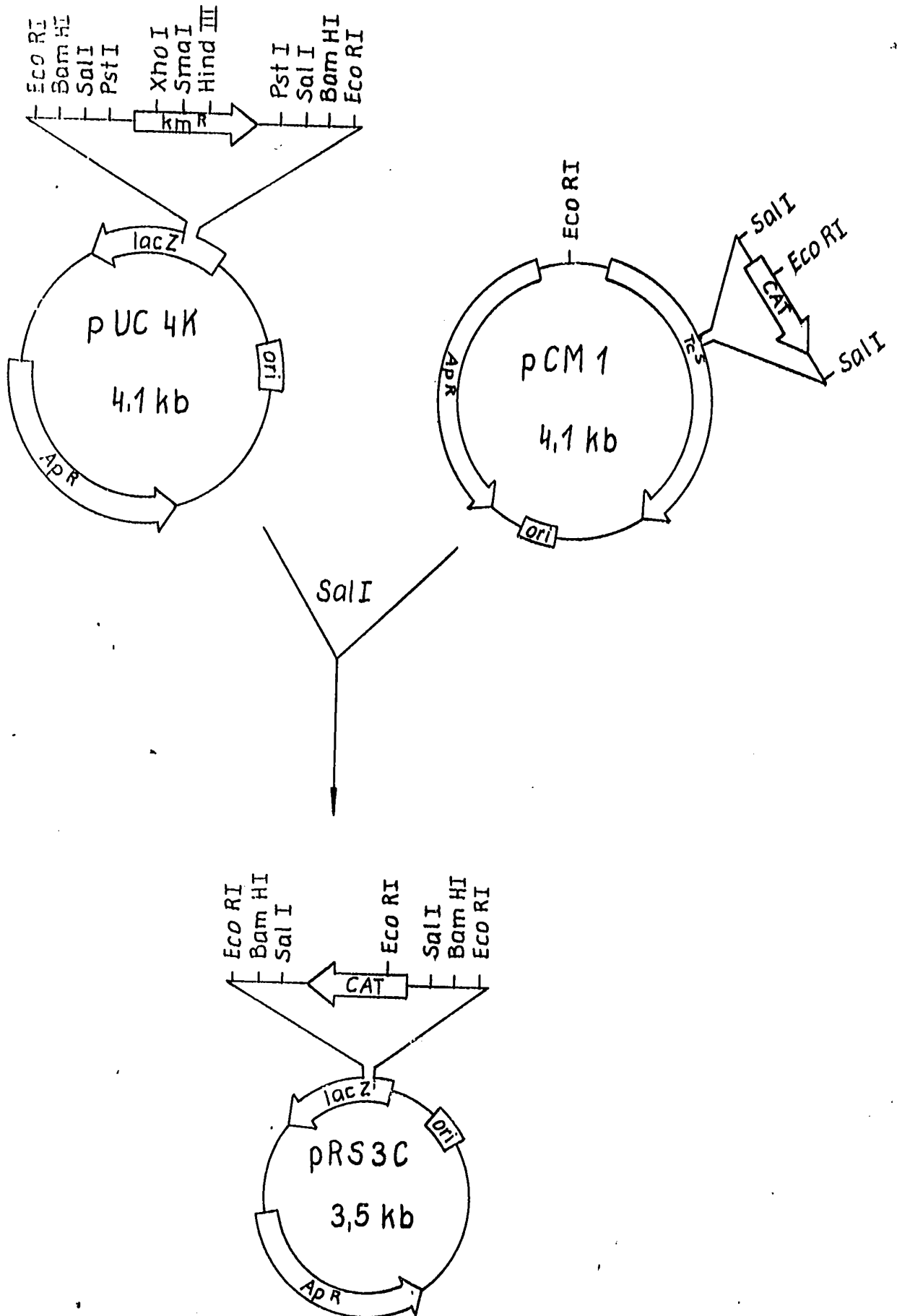


Abb. 3

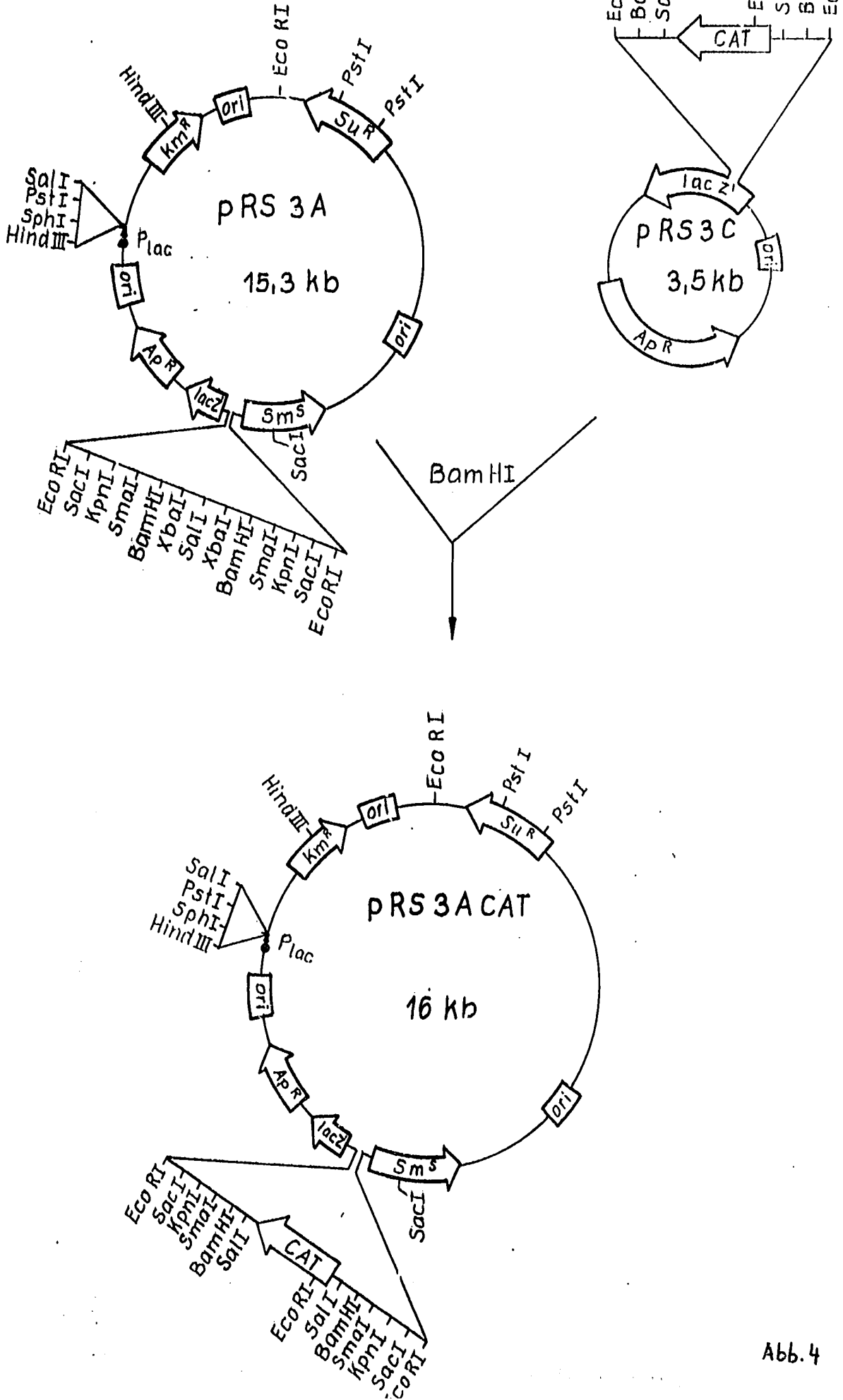


Abb. 4

