

## 五、發明說明 (1)

發明背景

本發明是有關分子遺傳技術之應用，以選殖編碼金黴素完全路徑之基因群 (DNA)，因此也是有關自生金鏈黴菌生合成的四環黴素，及其於異質宿主一變鉛青鏈黴素中的表現。經分離的生成基因群 (DNA) 充作受質以生物工程加強醱酵產率以及新穎的抗生素結構。

抗生素一金黴素及其衍生物化合物 (如四環黴素、脫甲基氨基四環素、脫甲基四環素) 商品化產製係利用生金鏈黴菌之淹沒醱酵而得 (Dugar, 1984)。此微生物 30 年以上的工業操作已發展出複雜的醱酵技術、及可令在醱酵產率上有顯著改進的培養基調和物 (Goodman, 1985)。這些於產率改進上的進展，由於生金鏈黴菌突變種之分離而更有助益，此菌種在抗生素產製上具增加的能力 (Veselova,

1969)。這些高產力的菌株大部份是由突變過程分離，之後進行任意篩選而有改進的產率。相同的技術可用於在抗生素生合成中被阻斷突變株之分離，此於金黴素形成之生合成次序上可當做評估用之重要工具 (McCormick, 1986)

除了這些成績以外，金黴素生合成之遺傳調控則尚未被完全了解。近來於鏈黴菌遺傳領域中之發展，已造成研究可產製工業上重要代謝物有機體之分子遺傳之機會

於放線菌遺傳學中，經由鏈黴菌原生質體融合及接下來的再生作用，關於染色體標誌重組作用之顯示是個重要的事件。然而在原生質體融合技術發展前，遺傳交配只於數種已證知具結合系統的種類中被信任地操作 (Hopwood,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明(2)

1967)，現今的遺傳分析可於可原生質化及再生的任何種類中進行。更重要的，後來證知原生質體係質體DNA轉形作用的一個理想受質，因此造成可於這些有機體中進行重組體DNA表現之機會(Bibb, et al, 1978)。數種具抗生素耐性基因之分離，如硫鏈絲菌肽(thiostrepton)、柴黴素(viomycin)及新黴素，可用於自固有的鏈黴菌質體中構築具選擇性的選殖載體(Thompson, et al, 1982)。

第一個被選殖的抗生素生合成基因之一為O-轉甲基酶，涉及抗生素色素-+-烷靈菌紅素(NDP)之形成(Feitelson, et al, 1980)。基因由其於NDP生合成路徑中補足已知突變作用之能力而鑑知。於這些分離生合成基因的早期努力中所應用的其他技術，包括對甲基新黴素採用噬菌體OC31之突變選殖(chater et al, 1983)，對放線菌素吩嗪吡啶合成利用活體的酵素分析之重組體純系sib選擇作用(Jones, et al, 1984)及涉及於加地黴素(candicidin)產製中由對位胺基苯甲酸合成酶所提供的磺胺類抗性(Gil et al, 1983)。比阿風(bialaphos)生合成基因經由經阻斷突變之補償作用而鑑知(Murakami et al, 1986)。

涉及於放線菌紫素生合成之基因，由天藍色鏈黴菌(streptomyces coelicolor)之生合阻斷突變之補償作用選殖(Malpartida et al, 1984)。於此後一週中，兩個重疊選殖的互補相異突變類被結合在單一的質體中其結果示可提供當引入異質的小小鏈黴菌(streptomyces

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (3)

parvulus) 宿主時可合成放線菌紫素之能力。

另一系列重要的觀察為，指導合成抗生素生合成之基因與於產製有機體中相同抗生素之抗性決定基是物質上相接的。因此，來自灰色鏈黴菌可提供鏈黴素抗性的DNA片段與補充生合成阻礙之DNA是連續的(Distler et al, 1985)。相同的位置可見於弗氏鏈黴菌(streptomyces foadicre)，其中生合成基因利用混合鹼基寡核苷酸探測粘接質體基因庫中同質物而予以鑑定，而這些寡核苷酸經構築可代表太樂菌素(tylosin)生合成路徑中終酵素胺基末端之DNA序列(Fishman et al, 1989)。先前經選殖的太樂菌素抗性基因(tlrB)經顯示係含於此DNA區域之中，其可補充9類型經阻斷突變(Baltz et al, 1988)。於嘌呤黴素(puromycin)中(Var2 et al, 1988)及丁省黴素(tetracenomycin)例中(Motamedi, et al, 1987)於抗生素性基因於異質宿主變鉛青鏈黴菌中表現之初步篩選，可於接下來進行座落在相同經選殖DNA片段上，抗生素生合成基因之鑑定。

使用核酸探針有助於分離生合成基因。此研究途徑有賴於存在有關於路徑既存之本身資料，或已進行先前之選殖作用。因此，於上文的太樂菌素例中，探針之構築係利用來自生合成酵素之部份胺基酸序列資料(Fishman, et al, 1987)。類似地，異青黴素N合成酶之基因選殖自S. Clavuligerus，係鑑定可與由酵素胺基末端胺基酸序列資料所構築之寡核苷酸探針雜事之純素而成(Cieskiw,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (4)

1988)。涉及於紅黴素生合成之基因，可由以先前選殖的紅黴素抗性基因探測粘接質體基因漸而予以鑑定 (stanzak, 1986)。同樣地，涉及於生氧四環黴素生合成之基因，其鑑定可由與先前經選殖的抗性決定子 (Butler et al, 1989) 及經合成代表相當於生合成醇素一無水四環素加氧之部份闡明的胺基酸序列之 DNA 序列的寡核苷酸均可雜交而成 (Binnie et al, 1989)。使用異質的 act I 及 act III 探針，可用來鑑定涉及於波賽鏈黴菌 (*streptomyces peucetius*) 中蒽環素生合成之基因 (stutzman-Engwall et al, 1989)。

這些技術個別地或組合地應用，可用來分離或組合完整的生合成路徑，且於某些例子中，可於異質宿主中表現。比阿風 (bialaphos) 完整的生合成群由補償活性之選擇及比阿風抗性之異質素現二者之組合而選殖 (Murakami et al, 1986)。對於完整路徑於變鉛青鏈黴菌中藉著篩選比阿風抗性之單一步驟而成功分離方面雖曾提及其重點，但是關於生合成基因之表現則未觸及。在上文中討論到放線菌紫素群自補償性純系中之組合，及其於小小鏈黴菌中之表現 (Malpartida et al, 1984)。

一個可與同源性衍生之紅黴素抗性決定子雜交之雙官能粘接質體純系，分離自紅黴素剛多胞菌基因庫，且示出當轉移至變鉛青鏈黴菌時可指令紅黴素之合成 (stanzak et al., 1986)。一個經顯示可與氧四環素抗性基因探針及生合成基因探針 (對無水四環素加氧酶而言) 均雜交之大腸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (5)

桿菌粘接質體純系，可用來自龜裂鏈黴菌中分離氧四環素生合成群 (Binnie et al, 1989)。接下來繼代選殖至鏈黴菌質體載體可於變鉛青鏈黴菌中產製氧四環素。

來自丁省黴素產製者的二個重疊的純系，由淡青鏈黴菌之阻斷突變補償作用、及於變鉛青鏈黴菌中提供丁省黴菌抗性之能力而鑑知 (Motamedi et al, 1987)。當二者分別駐留於變鉛青鏈黴菌中並共同醱酵，或當其共同駐留於相同的變鉛青鏈黴菌宿主中，可產製丁省黴素。由與天藍色鏈黴菌之 actI 及 actIII 探針雜交而自波賽鏈黴菌 DNA 之大腸桿菌基因間中分離的雙官能性純系，經顯示當引入變鉛青鏈黴菌時，可指令有色抗生素之合成 (Stutzman-Engwall, 1989)。

此外，分離產製西法黴素 C (Cepthamycin C) 生合成路徑已在進行 (Chen et al, 1988)。於此例子中，於變鉛青鏈黴菌中的任意純系，利用瓊脂加上醱酵方法，進行西法黴素 C 產製之個別篩選。在所篩選的 30,000 個純系中，一個變鉛青鏈黴菌之轉形細胞經顯示可產製西法黴素 C。

本發明是分離及利用與四環黴素及氧四環素製造之生合成路徑有關之 DNA 基因的第一例。

## 附圖簡要說明

圖 1：雙官能粘接質體載體之組織結構，及產生粘接質體之方法。粘接質體載體質粒 L 及 R 分別自質體 A 及 B 製得，如圖中所示及實例 3 詳述。單線代表構體之大腸桿

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

五、發明說明 (6)

菌複製子部份。於質體 A，大腸桿菌部份係均自 pBR322 中 3.7 kb 的 EcoRI-SalI 片段 (Sutcliffe, 1979)。質體乃含有一段來自 SCP2\* [加條紋的] 的 5.9 kb EcoRI-SalI 片段，其可提供於放線菌中之複製功能 (Larson et al, 1986)。

在二個質體上均有三個衍自 PHC 79 (Hohn et al, 1980) 700bp BglII -BstEII 含 COS 片段之並排的不齊端位置 [空心處]。質體 A 中存在的硫鏈絲菌肽抗性基因 [弄黑處] 係由回收自 pIJ702 的 1.1 kb BclI 片段衍生而來 (Katz et al, 1983)。質體 A 中 1.1 kb 之空間子區域 [條紋處] 係衍自酶菌體入的 SacI 片段 (Sanger et al, 1982)。

圖 2：LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128 之物理輿圖。二質體以限制酶輿圖示出相等的結構；因此，以一個結構代表二者示於此及圖 3。載體部份以雙線表示；TC/CTC 生合成區域以單線示出。選殖自金黴素鏈黴菌的 DNA 長 31.9 kb；載體為 1.1 kb。載體區域以 pIBI-24 (陰影處) 表示，硫鏈弱菌噁抗性處 (條紋表示)。標以 (+) 的二個 EcoRI 位置係衍自載體，並與界定載體及金黴素鏈黴菌 DNA 的 Sau3A-BglII 接處相鄰。

圖 3：選殖於 LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128 之金黴素鏈黴菌 DNA 之限制酶輿圖。選殖於 LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128 的 31.9 kb DNA 以線型示出。如此剖出輿圖，因此將衍自載體的 EcoRI 位置包括在內，分別位於左及右方充作起點及終點。限制片段大小以仟鹼基對表示，並在瓊脂糖凝膠电泳分析的正常解析

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

· · · · · 裝 · · · · · 訂 · · · · · 線 · · · · ·

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 (7)

限度之內為正確 (~ 500bp)。

發明要點

本發明是有關自生金鏈黴素中形成四環黴素及氯四環素的完全生合成路徑之選殖，及其於異質宿主變鉛青鏈黴菌中之表現。因此，本發明是有關經分離的DNA基因(群)，其可指導合成產製這些抗生素、氯四環素及四環黴素之生合成路徑，以及有關可於技藝中已知之迫切雜交步驟下可與指導合成氯四環黴素形成路徑之DNA經分離之基因群雜交之DNA。再者，本發明是有關使用這些基因以增加這些抗生素之產率，及篩選可產製四環黴素及氯四環素新類似物之方法。

為了進行生合成基因之分離，於是篩選重組體變鉛青鏈黴菌基因庫，以尋找表現四環黴素抗性之純系。包含基因庫之重組體粘接質體中之生金鏈黴菌DNA嵌入子必須夠大，因為所應用的活體外入包裝系統的約束，其中要求粘接質體分子之DNA嵌入子為25-40kb，以獲得可存活的傳導之噬菌體粒子。當四環黴素抗性純系自生金鏈黴菌基因體純系群中被選出，選出有限子集之粘接質體純系。這些中有許多或全部均預期可含有抗生素生合成基因，並連接至經選出之四環黴素抗性基因。在足夠大且被正確定位的這些中有一個包括完整生合成路徑之子集。因此，基因之選殖，及事實上所有用於四環黴素及氯四環素形成的基因，在結構或區域序列上可能沒有任何簡知之知識。雖然關於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (8)

四環黴素—抗性決定子 (Reynes-et al, 1988) 及來自生金鏈黴菌之溴過氧化酶 (Van Pee, 1988) 之選殖已有報告發表，但這些研究決不伸展至氯四環素生合成基因或完整基因群之分離。

本發明更詳盡的說明經由實例示於下文，其為本發明之說明並非其限制。

發明之詳細說明

用於 DNA 分離之方法，涉及細胞於滲透緩衝溶液中之菌酶水解作用，之後有緩和溶解、蛋白質萃取及高分子量 DNA 之加豐及濃縮。雖然所述的方法是有效的，而精於此技藝人士可確認，也可應用各種不同的方法，如 Hopwood et al, 1985 所述。

用於實例中之總 DNA 來源為金鏈黴菌 ATCC 13899，但本發明決不限於此特殊來源。本發明中，可產製四環黴素類抗生素之其他生金鏈黴菌變種也可用功地應用。這些生金鏈黴菌品系包括突變株及可產生氯四環素、四環黴素、6—脫甲氯四環素、6—脫甲四環黴素、7—氯—5a, 11a—脫氯四環素、2—脫羧基四環素—2—乙醯基四環素及其他化合物四環黴素成員之野生型分離物。本發明也是有關氯四環素、四環黴素及四環黴素—相關化合物，自其他可產製此化合物之有機體中之產物，此類有機體包括以下，但亦不限於此二馴製黴菌 (*S. griseus*)、愛梅諾黴菌 (*S. avellaneus*)、葡萄牙黴菌 (*S. lusitanus*)、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (9)

綠化性鏈黴菌 (*S. viridifaciens*)、生暗色鏈黴菌 (*S. psammoticus*)、燃燒馬杜拉放線菌 (*Actinomadura brunnea*) 及小囊指孢囊菌 (*Pactylosporangium vesca*)。

生金鏈黴菌 DNA 以限制酶 *Sau3A* 行部份水解，產生在欲求 35 仟鹼基範圍內之大 DNA 片段，其末端與應用之雙官能粘接質體載體臂呈同質。於此例中，進行一系列水解作用及以瓊脂糖凝膠電泳分析終產物樣品，可得最佳水解作用條件之實驗性決定。精於此技藝人士可確認不同的基因庫構築，及重要的經選殖 DNA 之回收方法。大腸桿菌之使用，以及由入包裝所限制的大小篩選，並不限制本發明，因此其他載體之使用也是有用的。精於此技藝人士可確認，如 pIJP22 之單官能鏈黴菌載體 (Lydiate et al, 1985) 可應用於本發明中，只要基因庫之構築及重組質體之回收在放線菌屬中進行。

於實例中之步驟包括：粘接質體臂及經大小分級分離 DNA 之連接作用產物之活體外包裝，至大腸桿菌 X 2819T 中之轉導作用，轉導細胞族群之收集及自其中分離 DNA 以生成粘接質體基因庫。說明所使用之方法，但本發明並不限於實例中所述者，另外的方法也可同樣地應用，而無不良的結果。因此，連接作用及活體外包裝之不同方法也可應用，也可應用另外的重組作用。缺乏性 (*recA*) 大腸桿菌宿主，基因庫擴大作用方法 (如選擇性肉汁之生長) 及質體製備方法，以上均發表於科學性文獻中 (Maniatis et al, 1982)。

## 五、發明說明 (10)

於實例中所述之接續步驟有：經匯集的粘接質體 DNA 製劑轉導至變鉛青鏈黴菌中，生成細胞庫；接下來篩選此庫以尋求可呈現對 100 微克四環黴素 / 毫升具抗性之變鉛青鏈黴菌轉形細胞。雖然較費事，轉形細胞可採複製片塗佈法進行四環黴素抗性之直接篩選。另外，可利用四環黴素濃度做篩選，由宿主或來源有機體所呈現之先天的抗性示出。其他對四環黴素具敏感性之非限制性宿主（如灰褐鏈黴菌）可用來取代變鉛青鏈黴菌。

接下來，回收重組質體，係自具四環黴素抗性之變鉛青鏈黴菌中分離質體 DNA，再將該 DNA 行活體外包裝，並得到至大腸桿菌之傳導作用。分離自此轉導細胞之質體 DNA 以限制酶與圖分析做結構鑑定；於實例中所分離出的二個質體 - LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128，經顯示有相同的結構。精於此技藝人士將可了解，自不同有機體中選殖之相似 DNA 區域，在限制位置排列上可呈現多元現象，但提供四環黴素一抗性之足夠大的 DNA 片段，預期可提供下文所述之特性：

四環黴素抗性之源自質體的本質，可由示出變鉛青鏈黴菌之硫鏈絲菌肽抗性轉形細胞（得自 LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128）也具四環黴素抗性而證實。類四環黴素抗生素之詳述，可由上述具硫鏈絲菌肽及四環黴素抗性之變鉛青鏈黴菌，於瓊脂上之產製而證明，其中抗生素活性足以有效拮抗大腸桿菌，但如此拮抗中的少數為具四環黴素抗性之大腸桿菌。

最後：示出四環黴素之合成於異質宿主——變鉛青鏈黴菌

## 五、發明說明 (11)

中係由 LP<sup>2</sup>127 所指令。此可於瓊脂及肉汁醱酵中完成。原先分離的四環黴素抗性變鉛青鏈黴菌及變鉛青鏈黴菌之 LP<sup>2</sup>127 轉形細胞，二者均可產生四環黴素及氯四環素，所在的條件為相同產物分離自 DNA 來源的有機體生金鏈黴菌 ATCC 13899。另一方面，只含質體載體而無嵌入的 DNA 之變鉛青鏈黴菌轉形細胞則無抗生素的產製。

四環黴素由異質宿主之產製，並不限於實例中所述之醱酵條件或 HPLC 分析系統，雖然這些可令清楚地有效分析。已描述許多四環黴素醱酵及分析的方法，且也可取代於此中。雖然實例中以變鉛青鏈黴菌為異質宿主，但抗生素合成基因之異質表現預期於許多放線菌及其他細菌中達成，如芽孢桿菌、棒桿菌、高溫放線菌等屬，只要其以此處所述之相當大的質體構體所轉形。可轉形的包括：灰褐鏈黴菌及生二素鏈黴菌，已知其相當不受限。

## 實例 1：製備生金鏈黴菌總 DNA

生金鏈黴菌 ATCC 13899 的凍乾燥製劑，懸浮於 0.8 毫升 1 x 合成醱溶液中（6 克 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 升，3 克 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 升，0.57 克檸檬酸鈉 / 升），並塗佈在本尼特氏 (Bennett's) 瓊脂上（1 克酵母浸膏 / 升，2 克 NZ 散 A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (12)

／升、1克牛肉浸膏／升、20克-D-葡萄糖／升、20克細菌瓊脂／升)。經28℃下培育2天後，來自單一培養盤中之細胞刮至5毫升胰化酪蛋白大豆肉湯(Difco)中，並以裝置有微量滴管之Heat Systems Ultrasonics W200P超音波震盪儀快速震盪(～10秒)。種子培養物之發展則接種2毫升經音波震盪的懸浮液至50毫升胰化酪蛋白大豆肉湯(TSB)中，再於28℃下，200 rpm 培育2天。之後5毫升種子培養物再接種至100毫升TSB中(其中添加有2%甘胺酸)，並以28℃、200 rpm 培育48小時。

細胞以9800Xg、離心30分鐘而回收。細胞團塊以200毫升P培養基洗滌(100克蔗糖／升、0.2克K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>／升、2毫升痕量元素溶液／升，其中含40毫克ZnCl<sub>2</sub>／升及各10毫克／升的FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O，CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O，MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O，Na<sub>4</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo724·4H<sub>2</sub>O)。細胞團塊於-20℃下冰凍，經解凍後懸浮於12毫升P<sup>+</sup>中(P培養基加上25mM TES，25mM CaCl<sub>2</sub>，10mM MgCl<sub>2</sub>，0.37mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)並含10毫克／毫升溶菌酶(Sigma，3X再結晶的)。細胞在室溫下培育2小時，此時可明顯看出原生質體之形成。再加2.5毫克的蛋白酶K(Boehringer-Mannheim)，且混合液於37℃下培育15分鐘。加10毫升0.2M EDTA pH 8，0.1M Tris pH 8可達到溶解，之後立即加入2.4毫升10%磺酸十二脂醇(SDS)粘稠的化合物於50℃下培育60分，並不斷地混合。一旦溶解完全，加入20毫升等量之鹽(50克鹽+

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (13)

6.5 毫升 100 mM NaCl , 10mM Tris pH 8 , 1 mM EDTA pH 8 + 0.05克 8-羥基喹啉) , 製劑緩和震盪 , 再於桌上型離心機中 , 以 1500 x g 離心 30分鐘。上方水層收集 , 如上述般再萃取 ; 經消耗的第一次萃取後的酚 , 以 20毫升 10mM Tris pH 7.4 , 1 mM EDTA pH 8 (TE)再反萃取。所收集之水相再以等體積氯仿萃取 , 如上述般離心 , 取出 10毫升部份至另一管中。對每一管加入 1 毫升 3 M 醋酸銨 pH 5 , 且 10 毫升冷乙醇輕覆此粘稠溶液之上方。DNA 緩和纏繞在玻棒上 , 以冷乙醇濕兩次 , 再溶於 8 毫升 TE 中 , 4 °C 下一夜。讀取 A260 之分度指數 , 以估計所存在之總核酸量 (大部份為 DNA) 。

實例 2 : 生金鏈黴菌 DNA 之部份水解及大小尺寸之加豐

生金鏈黴菌 DNA 之 Sau3A 水解產物在 35 仟鹼基範圍內之部份水解條件可由實驗決定。準備一系列反應試管 , 其中在由 100 mM NaCl - 10mM Tris pH 7.4 , 10 mM MgCl<sub>2</sub> 組成的 300 微升反應緩衝溶液中含有 ~ 25 微克 DNA , 再加入核酸內切限制酶 Sau3A (New England Biolabs) 至終濃度為每微克 DNA 有 0.5 、 0.1 、 0.05 、 0.01 、 0.005 酵素單位。反應於 37 °C 下進行 60 分 , 再置 65 °C 下 20 分 , 最後移至冰上。取出 20 微升 , 填至 0.5 % 瓊脂糖凝膠 , 以與已知長度之片段比較大小 (λ DNA 以 HindIII 、 XhoI 水解及未水解) 。剩下的 DNA 再依序加入 50 微升 3 M 醋酸及 1 毫升乙醇而沉澱 , 並於 - 20 °C 下冷卻。沉澱的 DNA 再以 880 x

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (14)

g 離心而成團塊，再溶解於 300 微升 0.3 M 醋酸銨中，同樣地沉澱，使成團塊，以乙醇潤濕，真空乾燥，且經乾燥的團塊最後溶於 100 微升 TE 中。以 1 伏特 / 公分電泳一夜之瓊脂糖凝膠，以溴化乙錠染色檢視顯示，以 0.05 單位 Sau3A / 微克 DNA 水解，可得大部份在欲求的 35kb 大小範圍內之水解產物。

## 實例 3：粘接質體載體之製備

雙官能的粘接質體載體之成份，係取自圖 1 所示之質體 A 及 B。質體 A 含有 pIBI24，其提供複製源及於大腸桿菌中複製篩選用之氯苄青黴素抗性基因。此質體也提供可於放線菌中進行質體篩選用之硫鏈絲菌肽抗性基因，以及來自噬菌體  $\lambda$  的多重不齊的末端位置 (cos)，其可充作活體外包裝用之受質。質體乃經設計可提供 SCP2\*、供質體保持於放線菌中所需之複製源，及多重的 cos 位置。

質體 A 以 Asp718 水解，再以牛腸鹼性磷酸酶 (CIAP) 脫磷酸化。之後，DNA 以氯仿萃取，經乙醇沉澱後再真空乾燥。之後再懸浮 DNA，並以 BxeII 水解。質體乃以 SalI 水解，再以 CIAP 處理。經氯仿萃取後以乙醇沉澱再真空乾燥，之後 DNA 再懸浮並以 BglII 水解。

上示之水解反應再填料至瓊脂糖凝膠，並電泳一夜。自瓊脂糖膠上，以電溶解分離出質體 A 中 6 Kb 片段及質體 B 中 8.0 Kb 片段，其係含有上述之官能區域。

## 五、發明說明 (15)

例 4：連接粘接質體至經 Sau3A 水解的基因體 DNA 上再行活體外包裝

生金鏈黴菌 DNA 經 Sau3A 水解及大小檢視之基因體片段，經由活體外連接作用連接至粘接質體質。4 微升經 Sau3A 水解的生金鏈黴菌 DNA，相當於 ~ 8 微克，將之與各 1 微克的粘接質體 1 及 2 於 10 微升連接混合物中混合，混合物內含有 66mM Tris pH 7.4，10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM ATP，10mM 二硫異赤絲藻醇及 40 單位（不齊末端單位）的 T4 DNA 連接酶（New England Biolabs）。連接混合物於 11℃ 下培育 18 小時，再將完整的 10 微升反應加至 Packagene<sup>®</sup> λ DNA 包裝系統萃物（Promega Biotec）中行活體外包裝反應。經室溫下 2 小時培育後入 500 微噬菌體稀釋緩衝溶液（PDB）（100mM NaCl，10mM TRIS-HCl，pH 7.4，10mM MgSO<sub>4</sub>），再加 25 微升氯仿。混合物渦旋並貯於 4℃ 下。

實例 5：轉導至大腸桿菌中並製備一個雙官能的粘接質體基因庫

由活體外包裝反應衍生而得的噬菌體製劑，轉導至大腸桿菌 X2819T 中（R. CurLiss），為了獲得上百個轉導細胞，並由此獲得經匯集之質 DNA 製劑，或雙官能粘接質體質基因庫。對於此，將 0.3 毫升一夜培養之 X2819T 接種至 10 毫升 20-10-5 中（20 克胰化蛋白胨 / 升、10 克酵母浸膏 / 升、5 克 NaCl / 升、50 毫克胸腺嘧啶 / 升），再於 28℃ 下培育

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝  
訂  
線



## 五、發明說明 (17)

溶液。CsCl—溴化乙錠混合物加至適當試管中，於 Beckman 70.1Ti 旋轉子中以 55,000rpm 離心 19 小時。取出試管，質體帶以注射器於管側穿刺而回收。樣品中之溴化乙錠以經水飽和之可醇等體積萃取 4 次而移出。水溶液以 TE 使達 6 毫升；加入 1 毫升 3 M 醋酸銨，質體 DNA 再以 1.8 毫升乙醇沈澱。經 -20℃ 下冷卻後，DNA 以 3400 X g 離心 30 分而成團塊。第二次沈澱則類似地操作，DNA 再以乙醇潤濕、真空乾燥、溶於 1 毫升 TE 中，並以分光光度法決定 DNA 濃度。

實例 6：將質體基因庫引入變鉛青鏈黴菌中，並構築一個變鉛青鏈黴菌重組體細胞庫。

於先前步驟構築之雙官能質體基因庫，轉形至變鉛青鏈黴菌 TK54 中，其中可獲得鏈黴菌基因之基因型表現。對於此，以基本標準方法 (Hopwood et al, 1985) 製備變鉛青鏈黴菌 TK54 之原生質體。簡言之，0.2 毫升孢子懸液接種於 10 份各 50 毫升的完全 YEME 培養基中 (3 克酵母浸膏 / 升、5 克蛋白腺 / 升、3 克麥芽浸膏 / 升、10 克葡萄糖 / 升、340 克蔗糖 / 升、5 克甘胺酸 / 升、5 mM MgCl<sub>2</sub>、各 10 毫 / 升的 L-組胺酸及 L-白胺酸)，此變鉛青鏈黴菌 TK54 經 45 小時培養後，細胞以 9800Xg 離心 15 分而成團塊。細胞團塊以 P 培養基洗兩次，再懸浮於 60 毫升 P<sup>+</sup> 中。加入 20 毫升含 14 毫克菌酶 / 毫升之 P<sup>+</sup>，懸液再於 30℃ 下、150rpm 之震盪水溶培育 90 分鐘。接下來，加入 100 毫升 P<sup>+</sup>。

## 五、發明說明 (18)

，原生質體懸液通過無菌的不吸收性棉。濾液以3800Xg離心10分鐘，原生質體團丟再懸浮，之後以100毫升P<sup>+</sup>洗滌，且經第二次離心後再懸浮於120毫升P<sup>+</sup>中。原生質體製劑分佈於1.8毫升冷凍管中，並於-70℃下冷凍。進行轉形作用，係將0.3毫升TK54原生質體製劑（含 $\sim 1 \times 10^9$ 原生質體）置入4隻含5毫升P<sup>+</sup>之離心管。原生質體以3400 X g離心10分鐘成團塊，再懸浮於殘留體積中。各管中加入約10微克的粘接質體基因庫DNA，再加0.5毫升25% PEG 1000（1克PEG 1000 [Sigma]溶於3毫升含下列組份之溶液：25克蔗糖/升、2毫升500 X 痕量元素溶液/升、0.25克 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/升、100mM CaCl<sub>2</sub>、50mM TRIS-馬來酸鹽，pH8）。經混合及再培育30秒之後，加入5毫升P<sup>+</sup>。原生質體再成團塊，及再懸浮於每毫升P<sup>+</sup>中。之後取1/10毫升塗佈在乾的R2YZ瓊脂上（100克蔗糖/升、0.25克 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/升、2毫升500 X 痕量元素溶液/升、2克L-脯氨酸IL、20克D-葡萄糖/升、5克酵母浸膏/升、0.005克 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/升、25mM TES、25mM CaCl<sub>2</sub>、5mM MgCl<sub>2</sub>、20克細菌瓊脂/升），再於28℃下培育。於24小時後，各培養盤再覆以3毫升軟瓊脂（調和物成份如上，但無酵母浸膏、葡萄糖、或 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，且含8克的細菌瓊脂，IL），其中並加有500微克硫酸鏈黴菌狀/毫升，再繼續培育12天。

可得約9100個具硫酸鏈黴菌狀抗性之生菌。將其自瓊脂上刮下，至3支各含25毫升20%甘油之管中。生菌懸液超音

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (19)

波震盪 90 秒使片段化，匯集，再置入 1.8 毫升冷凍管中，並於  $-70^{\circ}\text{C}$  下冷凍。此冷凍製劑構成變鉛青鏈黴菌重組體細胞庫。

實例 7：變鉛青鏈黴菌 LL535 之分離，其係具四環黴素抗性之轉形細胞，由此可衍生出質體 LP<sup>2</sup>127。

變鉛青鏈黴菌的重組體細胞庫，再接受四環黴素抗性之篩選。經成片段之變鉛青鏈黴菌細胞庫，取 1/10 毫升塗佈在本尼特氏瓊脂上，其中已添加 100 微克四環黴素 / 毫升。經  $28^{\circ}\text{C}$  下培育 5 天之後，可偵測到 2 個具四環黴素抗性之集落。選擇其一，LL535 (最初命名為 LL529-2) 做進一步分析。LL535 集落於含 100 微克四環黴素 / 毫升之新鮮本尼特氏瓊脂上劃線。經  $28^{\circ}\text{C}$  下 3 天後可觀察到生長。所得的生長物刮至 50 毫升添加有 10 克葡萄糖 / 升 (TSBG) 及 100 微克四環黴素 / 毫升之 TSB 中，懸液再置  $30^{\circ}\text{C}$ 、200rpm 下 3 天。LL535 培養物快速以超音波震盪，且取一部份至 1.8 毫升冷凍管中，並貯於  $-70^{\circ}\text{C}$  下。剩下的體積用來接種 4 支 2 升的燒瓶，其中各含 500 毫升經修飾之 4EMZ 培養基 (如先前所述，但含 16 克甘胺酸 / 升、25mM MOPS，且無  $\text{MgCl}_2$ 、L-組胺酸或 L-白胺酸)，並含有 100 微克四環黴素 / 毫升。經 2 天培養後之生長物，再做質體 DNA 分離之準備，如上所述除了所應用的所有體積為先前實例的 1 倍。最後的 DNA 沈澱物溶於每毫升 TE 中。

分離自變鉛青鏈黴菌轉形細胞 LL535 的質體 DNA，取 10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (20)

微升接受活體外包裝反應，再利用上文所述的方法轉導至大腸桿菌 X 2819T 中。具氨基青黴素抗性的轉導細胞（命名為 LL537）塗佈在含 100 微克氨基青黴素 / 毫升之 20-10-5 瓊脂上，於 30°C 下培養 1 天後之生長物再接種於 2 個 500 毫升、含 100 微克氨基青黴素 / 毫升之 20-10-5 肉汁上。經 30°C、200rpm 下培養一夜後，質體 DNA 如上述般分離。分離出的質體命名為 LP<sup>z</sup>127；質體經估計的大小為 43 鹼基對。

以限制酶進行單一及雙重水解可得 LP<sup>z</sup>127 之限制輿圖。BamHI、BclI、BglIII、BsmI、BstBI、ClaI、EcoRI、MluI、NcoI、SacI、ScaI、SphI 及 StuI (New England Biolabs) 之解離位置之決定，係以各個酵素單獨水解，或與切於載體部份已知位置之酵素（如 EcoRI、EcoRV 或 HindIII）組合水解而得。限制酶水解作用之進行，係將酶 - 2 微克的質體 DNA，可使所應用的限制酶有最佳狀況之 10 X 鹽溶液 4 微升、及約 5 - 40 單位的酵素混合於 40 微升之總體積中。所應用的 10X 鹽溶液如下：

於 BamHI、EcoRV 及 Sall：1.5M NaCl, 0.06M Tris-pH8, 0.06M MgCl<sub>2</sub>；於 BclIII 及 ScaI：1.0M NaCl, 0.1M Tris pH7.4, 0.1M MgCl<sub>2</sub>；於 BclI：0.75M KCl, 0.06M Tris pH7.4, 0.1M MgCl<sub>2</sub>；於 BstBI, 0.6M NaCl, 0.06M Tris pH7.4, 0.06M MgCl<sub>2</sub>；於 ClaI, 0.5M NaCl, 0.06M Tris pH8, 0.06M Tris pH7.4, 0.06M MgCl<sub>2</sub>；於 ScaI, 0.5M NaCl, 0.06M Tris pH8, 0.06M MgCl<sub>2</sub>；於 EcoRI, 0.5M

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (21)

Tris pH8, 0.1M MgCl<sub>2</sub>; 於 MluI, 0.5M NaCl, 0.1M Tris pH7.4, 0.1M MgCl<sub>2</sub>; 於 SacI, 0.1M Tris pH7.4, 0.1M MgCl<sub>2</sub>; 及於 StuI, 1.0M NaCl, 0.1M Tris, pH8, 0.1M MgCl<sub>2</sub>。以可與二種酵素相容之鹽濃度進行雙重水解, 如廠商之操作指示。所有的水解反應均在 37°C 下, 而 BclI 在 50°C, BsmI 及 BstBI 在 65°C 下操作為例外。反應時間為 60-120 分鐘。加入 5 微升經跡染料 (50% 甘油, 0.1M EDTA pH8, 0.25% 溴銨藍) 收集止反應, 並有助於接下來瓊脂糖凝膠之填充。

水解結果可由 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳示象。輿圖之決定係直接由 LP<sup>2</sup>127 以及繼代純系片段之直接水解而得。BclI 及 ClaI 位置之定位受制於宿主之甲基化作用, 且因此求助於 LP2258, 其係由 LP<sup>2</sup>127 活體外包裝, 再轉導至大腸桿菌 GM119 (dam-dcm-) 中而得, 且以先前所述之方法進行質體之分離。LP<sup>2</sup>127 之物理結構示於圖 2。選殖於 LP<sup>2</sup>127 中, 31.9kb 的生鏈黴菌 DAN 更詳細之限制酶輿圖示於圖 3。

實例 8: 雙鉛青鏈黴菌 LL529-TT2 之分離, 其為具硫鏈弱菌肽抗性性、四環黴素抗性之球形細胞, 由此衍生出菌體 LP<sup>2</sup>128

雙鉛青鏈黴菌 LL529-TT2 之分離以如 LL535 之相似方式進行, 除了重組雙鉛青鏈黴菌種與重組菌含有 50 微克硫鏈弱菌肽 / 毫升及 100 微克四環黴素 / 毫升之本尼特氏散

## 五、發明說明 (22)

脂上。經 28℃、11 天培育後，可觀察到 2 個具抗性集落。其中之一，LL529-TT2 於含此二抗生素之本尼特氏瓊脂上劃線。28℃ 3 天後，所得的生長物用於接種含有 10 微克硫鏈弱菌肽 / 毫升及 100 微克四環黴素 / 毫升之 50 毫升 TSB 中。經 28℃ 200rpm 下 5 天後，質體 DNA 以微量製備方法製備，此法在異丙醇沈澱步驟前與先前所述之質體分離步驟相似。然而，於此例中，所應用的體積為前者之 1/4。經異丙醇沈澱後，核酸團塊溶於 1 毫升 TE 中，再以等體積氯仿 (Chloroform) (500 克酚及 0.5 克 8-羥基喹啉平衡於含 100mM NaCl、1mM EDTA pH8、10mM 醋酸鈉 pH6 之緩衝溶液中，再加 500 毫升氯仿) 攪動萃取，之後以微量離心機全速離心 3 分鐘。水相再以氯仿及接下來的氯仿萃取，方式相似。收集最後的水相，加入 100 微升 3 M 醋酸銨及 1.8 毫升乙醇以沈澱核酸。經 -20℃ 下冷卻後，沈澱反應於 8800 X g 下離心 30 分。生成的團塊溶於 300 微升 0.3 M 醋酸鈉中，以 1 毫升乙醇類似地沈澱再離心。生成的團塊以乙醇潤濕，真空乾燥再溶於 1 毫升 TE 中。

使用 LL529-TT2 質體微量製劑，以進行如前述之活體外包裝。選擇具氨基青黴素抗性之轉導細胞 (命名為 LL538) 進行質體製備，其如 LL535 實例中所示進行。生成的純質體命名為 LP<sup>2</sup>128。當 LP<sup>2</sup>128 以 20 種不同的核酸內切限制酶水解所得之限制帶型式，與由 LP<sup>2</sup>127 所得者，以水解產物於相同的雷泳瓊脂糖凝膠上分析而比較。由 LP<sup>2</sup>128 所得之帶型式與 LP<sup>2</sup>127 中所見相同，顯示此二質體係相同的。因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (23)

此，圖 2 及 3 說明 LP<sup>2</sup>128 以及 LP<sup>2</sup>127 之結構。

實例 9：質體 LP<sup>2</sup>127 以及 LP<sup>2</sup>128 提供一個與質體相關之四環黴素抗性

為證明所遇之四環黴素抗性係源自質體，於是質體 LP<sup>2</sup>127 以及 LP<sup>2</sup>128 轉形至變鉛青鏈黴菌之原生質體，所得且硫鏈弱菌肽抗性轉形細胞再進行四環黴素抗性之測試。變鉛青鏈黴菌原生質體之製備及轉形作用，以及接下來硫鏈弱菌肽抗性轉形細胞之選擇係依前文所述進行。轉形 10 微克的 LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128，以及 5 微克的四環黴素敏感性對照組 -LP<sup>2</sup>111 (此載體含有 PIBI24、SCP2\* 複製作用穩定性區域，及硫鏈弱菌肽抗性性基因)。每個質體測試 150 個轉形細胞，再挑選至含 100 微克四環黴素 / 毫升或 25 微克硫鏈弱菌 / 毫升之成對的本尼特氏瓊脂盤上。

經 28°C 培育 5 天後計數穿刺培養之生長物。證明所有衍自 LP<sup>2</sup>111 的硫鏈弱菌肽抗性性轉形細胞均為四環黴素敏感株，而由 LP<sup>2</sup>127 或 LP<sup>2</sup>128 來的受試的硫鏈弱菌肽抗性性轉形細胞中，有 80% 為四環黴素抗性株。

實例 10：以含有 LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128 之變鉛青鏈黴菌產製氯四環素及四環黴素

進行一系列實驗，以證明 LP<sup>2</sup>127 及 LP<sup>2</sup>128 可於異質宿主變鉛青鏈黴菌中指令氯四環素 (TC) 及四環黴素 (TC) 之合成。原先的分離為 LL535，N 發現 LP<sup>2</sup>127 轉形的變鉛青

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線



## 五、發明說明 (25)

盤上覆有微生物之菌叢中檢視抑制環。LL531株無抗大腸桿菌之環帶，且在革蘭氏陽性之T1325中只有一些集落生成小的區域性環帶。後來的這些集落均呈現紅色，此為放線紫紅素表現之特徵；已知變鉛青鏈黴菌可以可觀察之頻率表現此正常的神秘路徑(Horinouchi et al., 1989)。比較之下，T1325及MM294之生長(於後一實驗中，每盤採用較少的集落，可在適當分散的個別集落且具有這些分析有機體之四週見到小、分散且極大的抑制環)。在本發明中，被MM294/pBR322加覆之LL535集落，可在集落四週顯示分散的環帶。由MM294/pBR322所具有的此減低之活性效應，可顯示由於駐留於質體pBR322上之四環黴素抗性表現，而導致此減低之敏感性。

於瓊脂上辛苦完成之抗生素，欲鑑定時可萃取融合狀培養物之瓊脂塊而進行。LL535及LL531株生長於含有25微克硫鏈弱菌肽/毫升之本尼特瓊脂上；生金鏈黴菌ATCC13899(即LP<sup>2</sup>127及LP<sup>2</sup>128中經選殖DNA之來源)則塗佈於不加等之本尼特氏瓊脂上。於30°C下培養5天後，切下1公分立方之瓊脂塊，並以3毫升酸性甲醇浸軟(11.5毫升濃硫酸於4升甲醇中)。經渦旋5分鐘後，上清液濾過Acro<sup>®</sup> LC-25濾膜，直接受HPLC分析。

HPLC分析係等濃度地於C18逆相管柱中進行，採用由含22% DMF-CN，N-二甲基甲酰胺及0.02%單酸磷酸鹽溶液組成之移動相。流速為1毫升/分，注射液以365毫微米檢測。以真實的四環黴素及變質品為標準品。

## 五、發明說明 (26)

HPLC層析圖顯示，LL535及ATCC 13899為產製物質，具有和TC及CTC相同之滯留時間。LL531萃取物不具這些峰。

以LP<sup>2</sup>127、LP<sup>2</sup>128及LP<sup>2</sup>63(一種質體載體，係pIBI24選殖至pIJ702之SacI位置)獲得的變鉛青鏈黴菌硫鏈弱菌抗性轉形細胞，加覆分析有機體T1325及MM294，進行抗生素產製之類似分析。LP<sup>2</sup>127及LP<sup>2</sup>128轉形細胞顯示所產製之抗生素可有效地拮抗二種分析有機體，而LP263轉形細胞則否，因此顯示產製抗生素之能加與存在於LP<sup>2</sup>127及LP<sup>2</sup>128中之生金鏈黴菌DNA有關。

也進行肉汁醱酵作用，以額外地證實由帶有LP<sup>2</sup>127變鉛青鏈黴菌所產製的為四環黴素及氯四環素。ATCC 13899、LL531、及LL873(一種變鉛青鏈黴菌之LP<sup>2</sup>127轉形細胞)之50毫升種子培養物，利用S培養基(4克酵母浸膏/升、4克蛋白胨/升、10克葡萄糖/升、0.5克MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/升)展開，其中含5微克硫鏈弱菌狀/毫升，於ATCC 13899則無硫鏈弱菌。經30°C下培養3天後，0.5毫升之種子培養物轉移至含有10微克硫鏈弱菌狀/毫升之25毫升醱酵液中(除了於ATCC 13899時不加菌)。經28°C下培養10天後，最終液汁取0.5毫升10倍，稀釋至4.5毫升酸性甲醇中，如前述處理再進行HPLC分析。LL531株不產生四環黴素化合物，而ATCC 13899、LL531及LL873則分別產製37、56及6微克/毫升之CTC。LL531株之醱酵液汁中也可偵測到少量的TC。

五、發明說明 (27)

大腸桿菌 LL537株及 LL538株為大腸桿菌之轉導細胞，由此可分離出質體 LP<sup>2</sup>127及 LP<sup>2</sup>128，並在布達佩斯條約下貯置於美國標準菌種收集所 (12301 Parklaon Drive, Rockcille, Maryland)，且具有如下之編號。大腸桿菌 x 2818T 含 LP<sup>2</sup>127 (LL537)，具編號 ATCC68357，及大腸桿菌 X2819T，含有 LP<sup>2</sup>128 (LL538) 具編號 ATCC 68358。二者入檔於 1990年 7月 10日，且當其合法應用時可供應至大眾。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

.....  
 裝.....  
 訂.....  
 線.....  
 )

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要(發明之名稱：自生金鏈黴菌(STREPTOMYCES AUREOFACIENS)選殖合成)氯四環素之生物合成途徑基因，及其於變鉛青鏈黴菌(STREPTOMYCES LIVIDANS)之表現

本發明是有關DNA (分離生金鏈黴菌 streptomyces aureofaciens 片段) 之選殖及分離，其可於異質的宿主，如變鉛青鏈黴菌(streptomyces lividans) 中指令四環黴素及氯四環素(金黴素)的合成。所申請專利範圍的質體係由篩選構築於大腸桿菌的粘接質體庫而分離，可於變鉛青鏈黴菌中表現四環黴素抗性。

英文發明摘要(發明之名稱：CLONING OF THE BIOSYNTHETIC PATHWAY GENES FOR CHLORTETRACYCLINE PRODUCTION FROM STREPTOMYCES AUREOFACIENS & THEIR EXPRESSION IN STEPTOMYCES LIVIDANS)

The present invention relates to the cloning, isolation and DNA (isolated fragment from Streptomyces aureofaciens) which directs the synthesis of tetracycline and chlortetracycline, in a heterologous host such as Streptomyces lividans. The claimed plasmids are isolated by screening a cosmid library, constructed in Escherichia coli, for the expression of tetracycline resistance in S. lividans.

附註：本案已向 美 國(地區)申請專利、申請日期：1990.7.26. 案號： 07/558,039

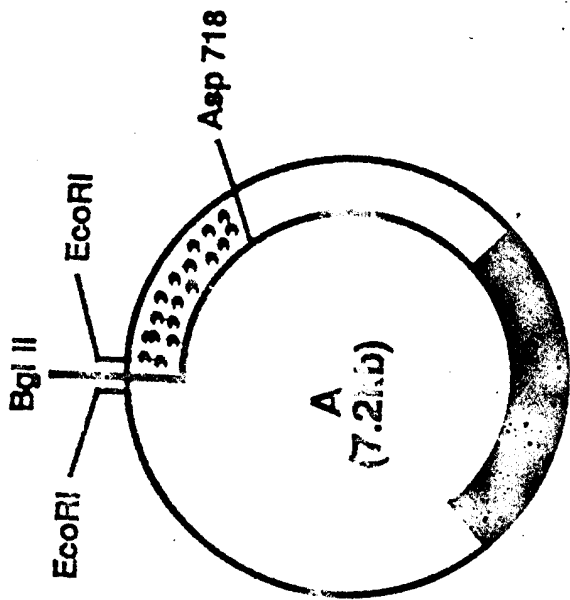
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

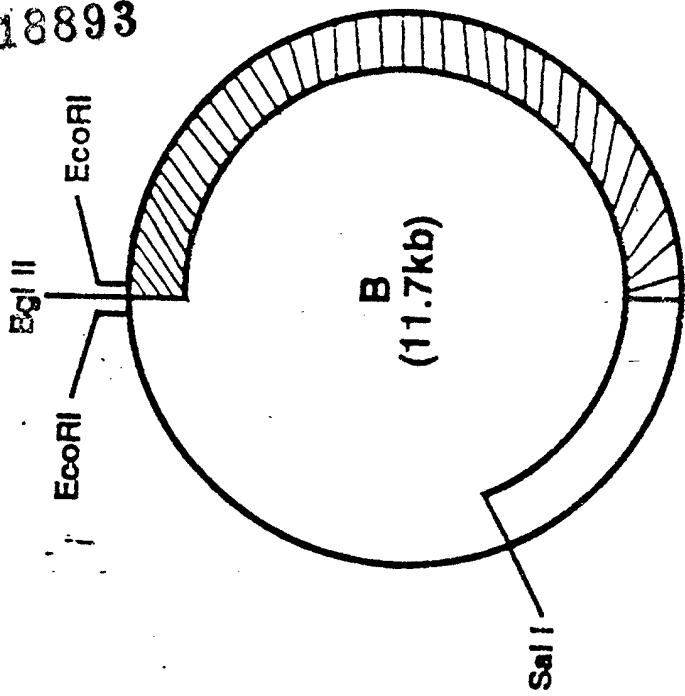
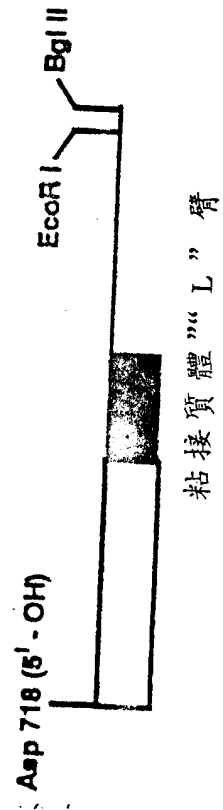
訂

線

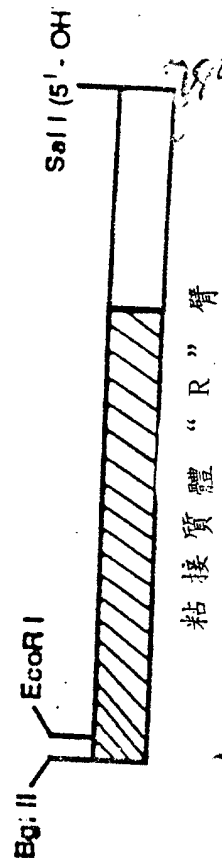
218893



- ▼ **Asp 718** 水解
- ▼ 以 CIAP 處理
- ▼ **Bgl II** 水解
- ▼ 瓊脂糖凝膠電泳
- ▼ 分離 6.1 kb 片段

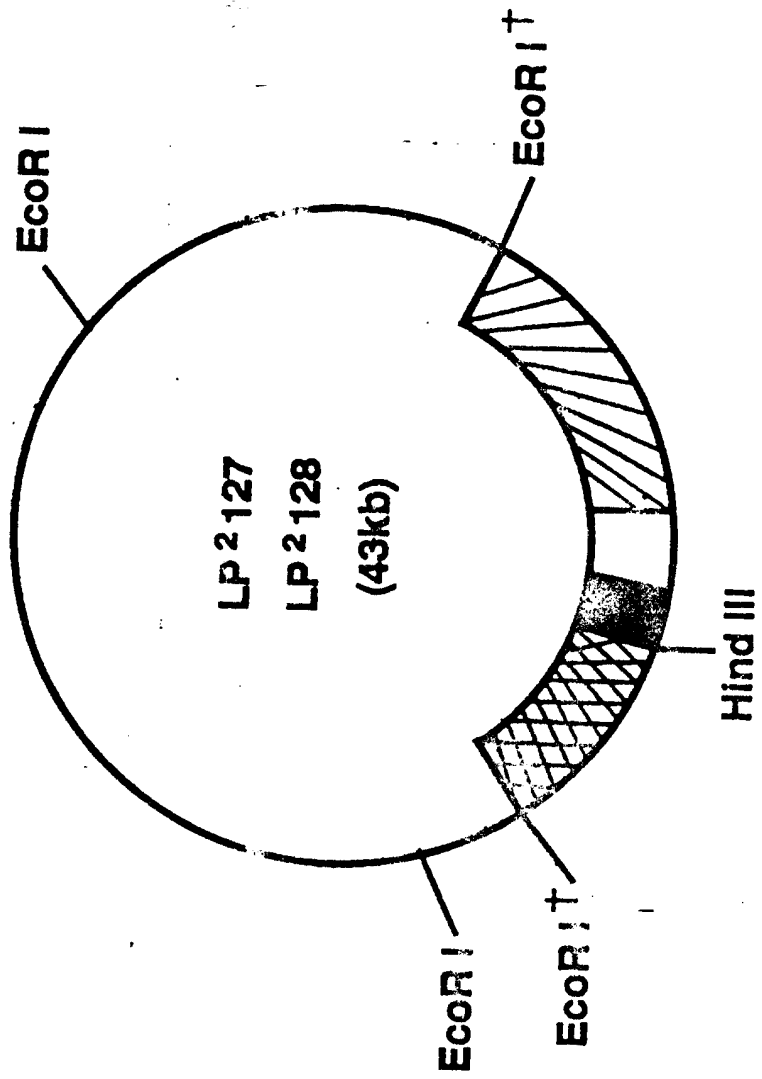


- ▼ **Sal I** 水解
- ▼ 以 CIAP 處理
- ▼ **Bgl II** 水解
- ▼ 瓊脂糖凝膠電泳
- ▼ 分離 8.0 kb 片段



218893

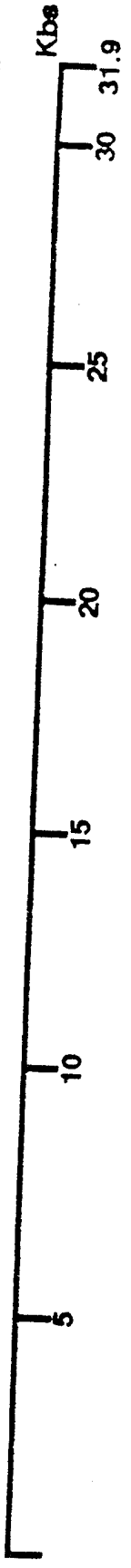
2



218893

圖 3.

1.0	6.9	11.8	2.6	5.9	1.2	1.4	Bam I
1.7	16.8	4.7	10.4	1.3	6.4	Bcl I	
4.2	22.5	27.7	22.5	22.5	Bgl II		
3.0	9.4	22.5	22.3	20.1	10.0	Bam I	
1.8	6.6	20.1	28.1	3.8	1.8	Bet BI	
2.7	4.3	5.7	1.6	9.6	5.5	Clb I	
2.7	3.8	3.8	2.0	2.3	1.6	EcoR I	
4.5	13.7	11.2	7.4	11.2	11.2	Mlu I	
2.5	2.5	9.9	1.0	2.5	6.9	Nco I	
7.8	11.2	2.6	6.4	2.4	1.5	Sac I	
						Sca I	
						Sph I	
						Stu I	



218893

修正 81.12.04  
本 年 月 日  
補充

申請日期	80.6.29
索 號	80105067
類 別	C12N 15/11

公告本<sup>A4</sup>

修正頁 87.12

(以上各欄由本局填註)

## 發 明 專 利 說 明 書

### 新 型

一、發明 名稱	中 文	自生金鏈黴菌 (STREPTOMYCES AUREOFACIENS) 選殖合成氯四環素之生物合成途徑基因，及其於變鉛青鏈黴菌 (STREPTOMYCES LIVIDANS) 之表現
	英 文	CLONING OF THE BIOSYNTHETIC PATHWAY GENES FOR CHLORTETRACYCLINE PRODUCTION FROM STREPTOMYCES AUREOFACIENS & THEIR EXPRESSION IN STREPTOMYCES LIVIDANS
二、發明 人	姓 名	1 傑生·艾·羅文 JASON A. LOTVIN 2 邁克·傑·布萊恩 MICHAEL J. RYAN 3 南茜·史翠西 NANCY STRATHY
	籍 貫 (國籍)	均美國
	住、居所	1 美國紐澤西州聯邦市羅斯福大道985 號 2 美國紐澤西州西米爾佛德市北樹林大道34號 3 美國紐約州蒙西市小河邊巷16號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國氰胺公司 AMERICAN CYANAMID COMPANY
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所 (事務所)	美國紐澤西州韋恩市湯西普鎮
	代 表 人 姓 名	艾鳳斯·爾·諾伊 ALPHONSE R. NOE

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

第 105067 號專利申請書  
是申請專利範圍修正本(2年9月)

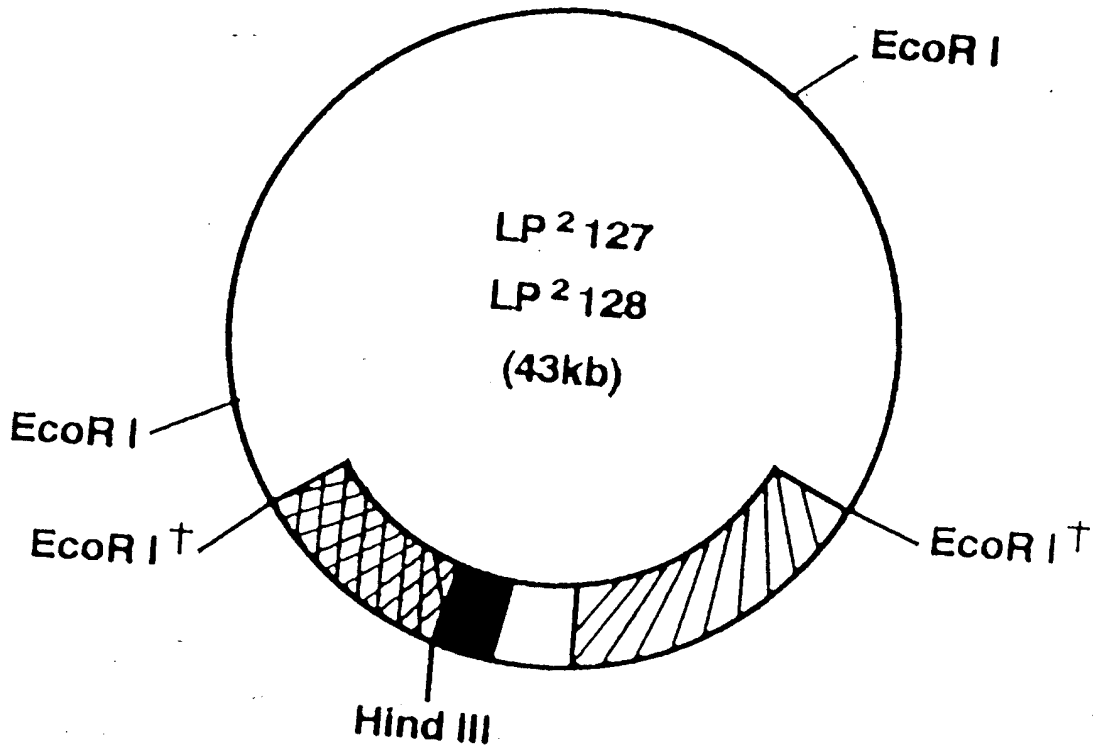
六、申請專利範圍

修正 82.9.22  
本 年 月 日  
補充

公 告 本

218893

- 1 一種經分離之DNA基因群，編碼四環黴素及氯四環素之生合成路徑，該基因群座落在LP<sup>2</sup>127或LP<sup>2</sup>128中，該LP<sup>2</sup>127或LP<sup>2</sup>128具下列物理與圖：



其中該質體具分離自生金鏈黴菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 之DNA片段且其限制圖譜如下：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

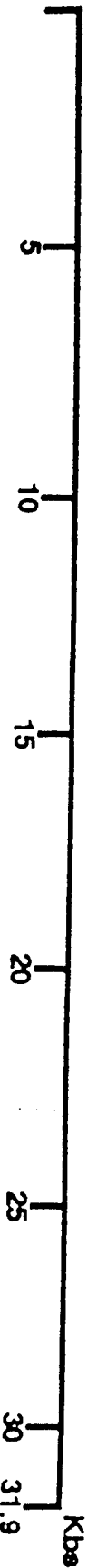
線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

..... 裝 ..... 打 ..... 線 .....

A7  
B7  
C7  
D7

1.0	6.9		11.8		2.6	5.9	1.2	1.4	Bam HI
	16.8			4.7		10.4			Bcl I
1.7		22.5				6.4			Bgl II
4.2			27.7						Bam I
	9.4			22.5					Bst BI
3.0	6.6			22.3					Cla I
1.8		20.1				10.0			Ecor I
			28.1					3.8	Mlu I
2.7	4.3	5.7	1.6	9.6		5.5		1.8	Nco I
2.7	3.8	3.8	3.2	2.0	2.3	1.6	11.2		Sac I
4.5		13.7			7.4			5.8	Sca I
2.5	2.5	9.9	1.0	2.5	6.9		6.6		Sph I
	7.8		11.2		2.6	6.4	2.4	1.5	Stu I



六、申請

218893

## 六、申請專利範圍

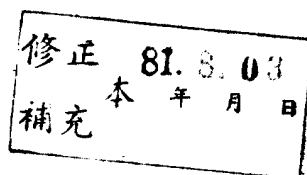
- 2 根據申請專利範圍第1項之經分離之DNA基因群，其中該DNA於原核細胞宿主中表現。
- 3 根據申請專利範圍第2項之經分離之DNA基因群，其中該宿主為大腸桿菌或變鉛青鏈黴菌 (Streptomyces lividans) 或生金鏈黴菌 (Streptomyces aureofaciens)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



第 80105067 號 專利 申 案

補 充 說 明 書 (81 年 8 月)

#### A. LP2-127 於 南 方 雜 交 法 中 之 用 法

粘 接 質 體 純 系 LP2-127 含 有 一 個 基 因 體 DNA 嵌 入 子，來 自 金 黴 素 鏈 黴 菌 ATCC 13899 菌 株，其 可 指 令 四 環 素 (TC) 及 金 黴 素 (CTC) 於 異 質 宿 主 - 鉛 青 鏈 黴 菌 中 之 合 成。於 南 方 雜 交 中 完 整 的 粘 接 質 體 純 系 充 作 探 針，獨 自 拮 抗 分 離 出 之 TC/CTC 產 製 性 金 黴 素 鏈 黴 菌。

以 類 似 先 前 所 述 之 方 法，自 金 黴 素 鏈 黴 菌 A377 菌 株 中 分 離 基 因 體 DNA。A377 菌 株 基 本 上 和 ATCC 10762 貯 置 株 相 同。基 因 體 DNA 以 EcoRI 及 SacI 水 解，接 受 瓊 脂 糖 凝 膠 電 泳，再 轉 移 至 耐 綸 膜 上。之 後 於 南 方 雜 交 反 應 中 應 用 標 記 有 異 脛 洋 地 黃 毒 苷 元 之 LP2-127，拮 抗 固 化 在 濾 膜 上 之 A377 DNA。使 用 Boehringer Mannheim Genius 的 DNA 標 記 及 偵 測 套 組 以 產 生 標 記 有 異 脛 洋 地 黃 毒 苷 元 之 針。雜 交 作 用 及 顏 色 之 具 象 化 反 應，依 套 組 中 所 建 議 的 進 行。

A377 株 顯 示 出 強 烈 的 雜 交 帶。雜 交 DNA 片 段 之 大 小 符 合 圖 3 所 示、ATCC 13899 TC/CTC 群 之 限 制 輿 圖；包 括 於 各 例 中 二 個 雜 交 帶，其 可 能 代 表 與 所 選 殖 群 任 一 端 同 質 之 片 段，伸 展 至 基 因 體 中 相 接 之 側 邊 序 列。於 SacI 例 中，並 未 觀 察 到 雙 重 的 3.8 kb 帶，而 是 觀 察 到 3.8，3.0 及 0.8kb 之 雜 交 帶；也 觀 察 到 其 他 所 有 預 期 的 雜 交 片 段。EcoRI 水 解 物 顯 示 於 1.0 及 19.1 的 雜 交 帶，而 非 20.1 之 單 一 帶。接 下 來 之 定 輿 圖 實 驗 顯 示，A377 中 TC/CTC 區 之 限 制 輿 圖 相 當 LP2-127 者，除 了 在 8.8kb 有 一 個 額 外 的 SacI 位，在 2.8 kb 處 有 一 個 額 外 的 EcoRI 位。因 此，片 段 大 小 上 微 小 的 差 異 可 歸 於 ATCC 13899 純 系 (及 基 因 體，後 者 由 南 方 雜 交 証 實) 及 ATCC 10762 基 因 體 (後 者 於 粘 接 質 體 純 系 中 証 實) 上 存 在 有 限 制 位 置 之 多 態 性。區 域 其 餘 部 份，對 SacI 及 EcoRI 有

相同的限制與圖，且 BamHI 及 NcoI 限制與圖亦然。

數據顯示，獨立分離出之 TC/CTC 產製性金黴素鏈黴菌，可與 LP2-127 中存在的金黴素鏈黴菌 DNA 強烈雜交。此外，數據推測獨立分離出之 TC/CTC 產製者也可顯示一些演化趨勢之證據，此可由觀察到限制位置多態性，但仍保有充份同質性以供雜交窺之。以下的實驗已說明具相似的雜交行為，此係當以 LP2-127 中金黴素鏈黴菌中分離出之 DNA 片段為探針，減少載體序列涉及雜交反應的任何困擾。

H. DHCTC 產製者均質化以產生 CTC。

來 LP2-127 的繼代選殖 DNA 片段，引入金黴素鏈黴菌之突變株中以構築生合成區之遺傳與圖。所應用的突變株為 A377 已發展株之衍生物，其在 TC/CTC 生合成序列中有顯而易見的傷害（即，經阻斷的突變株），其導致形成不同的產物，生合成中間物或無可鑑定的產物或中間物。這些突變作用若非全部，也是大部份包含在其中 A377 衍生物可與 LP2-127 中經選殖之 TC/CTC 區強烈雜交之基因體區域內，地點被視為極可能。LP2-127 序列及 A377 基因體間既有此結構上的相似性（及因此其衍生物），因此可預期將與來 LP2-127 正確繼代純系有關之野生型對偶基因引入這些突變株中，將可“恢復”產生抗生素之能力。此功能的恢復可由討論中之特性補充而達成（若對偶基因表現在質體上）或經由衍自質體之野生型對偶基因與物理上類似的有缺失染色體對偶基因行重組作用交換而成。

來自 LP2-127 內部 SacI、NcoI 及 BamHI 片段之完整系列，繼代選殖至高套數、單功能、及硫鏈絲菌狀一可選擇之衍 PIJ488 之鏈黴菌複製子 - pPP-14 中。使用 pPP-14 中獨一的 SacI 及 BamHI 選殖位置。於 NcoI 片段例子中，使用 DNA 聚合酶之 Klenow 片段來充填 NcoI 端，其再連結至載體中經充填之 5'- 去磷酸化之 BamHI 位置。DNA 之水解，純化及連接，如先前所述地進行。用於繼代選殖之異質宿主為雙鉛青鏈

菌。經連接之混合物再引入變鉛青鏈黴菌之原生質體中，其以硫鏈絲菌肽選擇作用再生，如先前所述。討論中之純系，以小規模質體微量製備鑑定，且而後利用大規模（500-1000毫升培養物）質體純系流程，如先前所述地操作。

質體繼代純系之完全系列，再轉形至重點之金黴素鏈黴菌株中。於此實例中，1E-1355 及 1E-2803 株，其係衍自 A377 之衍生物，接受轉形作用研究。每一菌株於 C6- 甲基化作用中阻斷，如此累積之抗生素為 TC-CTC 之 C6- 去甲基衍生物。即這些菌株產生多數的 C6- 去甲基-金黴素 (DMCTC) 及痕量的 C6- 去甲基-四環素 (DMTC)。1E-1355 及 1E-2803 菌株不會累積任何可測及之 TC 或 CTC。繼代純系個別轉形至這些金黴素鏈黴菌原生質體中。原生質體形成、再生、選擇及經轉形株之回收等步驟，類似於變鉛青鏈黴菌中所用的。

經轉形金黴素鏈黴菌菌株之種子培養物，在硫鏈絲菌肽選擇作用下，生長於以胰化酪蛋白大豆培養液為基礎之培養基，基本上如變鉛青鏈黴菌所述。部份種子用於培養物之保存。種子也用於接種至震盪一燒瓶醱酵中，其培養基為該菌株所適用者。於醱酵作用中保持硫鏈絲菌肽之選擇作用。以質體 LP2-467 所轉形的 1E-1355 株（含有 3.2kb SacI 片段之 pPP-14）發現是重點轉形子，且命名為 LL1470 株。以 HPLC 分析發現，此轉形細胞可產生 DMCTC、CTC、DMTC 及 TC 混合物。以 pPP-14 轉形的同一菌株，可產生 DMCTC 及 DMTC，但無可測及之 CTC。於此系列中，以其他 SacI 繼代純系轉形之分離物，只產生 DMTC/DMCTC，無可測及之 CTC。由 LL1470 株中所觀察到的混合 DMCTC 及 CTC 產物推測，其係進行部份的均質化作用。預期調介補充作用之質體，可生成全部甲基化之終產物 (CTC)，因為野生型甲基作用對偶基因預期作用如同優性形質。

因此，由上文導致出之初步結論建議，部份含有 LL1470 之細胞族群

，已用質體對偶基因交換染色體對偶基因，而造成TC/CTC之產製。為說明此，質體DNA自細胞中消除。為達成此點，可於硫鏈絲菌肽不存在下，將LL1470原生體化及再生之。鑑定一組22株對硫鏈絲菌肽敏感之衍生物，並如上述地醱酵。有8株仍產生DMCTC而無任何可測及之CTC，但4株分離物可產生約4克/升的CTC及一般見於CTC醱酵作用少的TC及DMCTC。自4株硫鏈絲菌肽一敏感且CTC產製者之一中(LL1568)分離DNA，於南方雜交實驗中顯示無衍自質體之序列。因此，似乎在質體及宿主DNA中發生重組作用，而造成IE-1355衍生物，其可熟練地甲基化。因此IE-1355之CTC產率由低於HPLC可偵測下限升高至約4克/升。

以5.7kb NcoI片段之繼代純系(LP2-464)進行類似實驗，此片段與先前應用的3.2kb SacI片段重疊。此純系引入IE-2803株中。應用如上述之相同步驟，且可得類似的結果。頃發現，經轉形細胞之經處理衍生物產生CTC及少量的TC及DMCTC為唯一產物。此種分離物二株為LL1575及LL1578，二者產得約7克/升CTC。以分離自二者之DNA行南方雜交，發現並不含載體序列。此外，頃發現LL1578株失去實例A中所述，於8.8位置處之多態性SacI位置，其係通常見於A377-衍生株中。因此，於此分離物中有由質體至染色體之重組交發生，其不僅涉及C6-甲基化作用功能，也涉及在所應用的5.7 kb NcoI片段內所含之SacI異質性區域，後一交換對於所申請專利範圍之重組作用交換上提供物理性證明。

#### C. TC產製者均質化以產生CTC

以在C7-氯化作用被阻斷的金黴素鏈黴菌(T377)株，進行類似實例B所述之一系列實驗。此株產生TC為主要醱酵產物，而伴隨的CTC量極低或常在HPLC偵測限制之下。以此菌株進行實驗之意圖，係將

LP2-127 中之氯化作用功能引入 T377 中，以研究恢復的 CTC 產製之結果。

T377 菌株以 BamHI 繼代純系之完全組轉形；分離及醱酵轉形細胞，如先前所述。發現含有 11.8kb BamHI 繼代純系 (LP2-404) 之轉形細胞 (LL1189) 可產生 0.2 克 / 升 TC 及 0.3 克 / 升 CTC，而以 pPP-14 轉形 T377，產生 0.3 克 / 升 TC 但無可測及之 CTC。另一 BamHI 繼代純系也生成轉形細胞，其只產生 TC 無可測及之 CTC。

分離物 LL1189 如先前所述地保存質體。90 株硫鏈絲菌敏感分離物再如上地予以醱酵。發現這些分離物中 59 株，顯示類 T377 之產製特性；即主要的醱酵產物是 TC，加上極少或無可測及之 CTC。例如，分離物 7900L-155-14 生成 9.4 克 / 升 TC 及 < 0.01 克 / 升 CTC。

31 株分離物顯示 CTC 產製株之典型產製特性，而其中 CTC 是主要產物。代表性分離物 LL1586 及 LL1587，分別產生 0.3 克 / 升 TC + 6.1 克 / 升 CTC，及 0.3 克 / 升 TC + 5.6 克 / 升 CTC。因此，34.4% 的 LL1189 族群被均質化以產生 CTC。如 LL1586 之均質化菌株，可視為較 T377 為改進之 CTC 產製者，因 T377 產生 < 0.02 克 / 升 CTC。

如先前實例中所示，總 DNA 分離自 LL1586 及 LL1587 株中，以 SacI 水解再接受南方雜交分析。二株均顯示並無任何與質體載體有關之序列之跡象。LL1586 株顯示典型的 A377 SacI 限制型式，而 LL1587 株在 8.8 位置缺乏類 A377 之多態性 SacI 位置。如先前實例所述，LL1587 之雜交作用提出一個物理性明示，即除了無質體衍生物之醱酵行為外，在居留的質體及宿主染色體間有重組交換發生。

#### D. 自 LP2-127 中繼代產殖四環素 - 抗性之決定子

測試上文實例 B 中 BamHI 繼代純系組，其於異質宿主雙鉛青鏈黴菌中提供四環素 - 抗性之能力。雙鉛青鏈黴菌之轉移細胞培養於含硫鏈

絲菌肽之胰化酪蛋白大豆培養液中，再塗佈於含有25微克／毫升四環素之Bennett's瓊脂上。6.9kb BamHI 片段(LP2-406) 及2.6kb BamHI 片段(LP2-408) 之繼代純系，為可提供四環素抗性組中唯一成員。這些BamHI 片段於粘接質體系LP2-127 之kb與圖位置，為6.9kb 片段中1.0 至7.9 ，及2.6kb 片段中19.7至22.3。數據顯示LP2-127 中二個物理上可分開且非重疊的DNA 片段，足以獨立地提供四環素抗性。此推測在LP2-127 內至少含有二個四環素抗性基因。此可推論，此中任一株單獨均可提供充份的四環素抗性，而可以本案主題方法，自金黴素鏈黴菌株中分離部份的TC/CTC生合成路徑。

#### E. 自3E-2168 菌株中選殖DMTC/DMTC 生合成區域

利用本案內容中的方法，物質及衍生物質進行一系列實驗，以自DMTC/DMCTC產製株2E-2168 中選殖DMTC/DMCTC生合成區。此金黴素鏈黴菌選自A377株衍生物。基因體DNA 分離自3E-2168 ，以Sau3A 部份水解，並如前述般使大小加豐。經Sau3A 水解的基因體DNA 再連接至經修飾的雙功能粘接質體選殖系統之雙臂。經修飾的載體為本案內容中所述載體之修飾版。質體LP2-160 取代質體A，且提供三個不齊端位置，硫鏈絲菌肽 - 抗性基因及SalI651-PvuII 2064刪除之pBR322。此臂之製備係依序處理以Asp718、牛腸鹼性磷酸酶(CIAP)及BamHI。質體B以LP2-107 取代。此取代質體提供三個不齊端位置，複製作用之SCP2源，及衍自SCP2的5.5kb EcoRI-SacI穩定區。此第二臂由HindIII，CIAP及BamHI 依序處理而生成。二臂均是於使用前自瓊脂糖凝膠上行大小選擇及純化的。於包裝，轉導至大腸桿菌及製備匯集的粘接質體DNA 連中所用的步驟，和先前所述相當。

基因庫轉形至雙鉛青鏈黴菌中，且由硫鏈絲菌肽選擇之轉形細胞匯集，音波震盪再如前述地貯存。以部份經音波震盪之匯集物接種於含

有 5 微克 / 毫升硫鏈絲菌肽及 250 微克 / 毫升四環素之胰酪蛋白大豆培養液中。7 天後觀察生長情形，此時回收細胞。自收集的細胞中分離 DNA，且部份接受試管內包裝反應，並轉導至大腸桿菌。製備微是質體製劑，並接受分析性限制酶水解與 LP1-127 水解物比較。頃發現  $\lambda$  P19-26 株含有與 LP2-127 具某些相似性之質體。自  $\lambda$  P19-26 中進行大規模 DNA 之純化，生成質體 LP2-375。

由更詳盡的限制與圖及以經異洋地黃毒苷元標記之 LP2-127（以及以繼代純系）探測顯示，LP2-375 中含有來自 3E-2168 之部份 DMTC/DMCTC 生合成群。與圖顯示已選殖由 1.0 位置 BamHI 位至 16.8 位置 SacI 位置之部份群區（共 15.8kb）。一個額外的 10kb、顯然不連續的 DNA 與之相接，且由 "16.8" 之 SacI 位置附近延長。所選殖的區域，分別在 2.8 及 8.8 位置處呈現多態性之 EcoRI 及 SacI 位置，此為 A377 衍生株之特色。

在 LP2-375 中含有二個重點區域。首先，質體含有完全的 6.9kb BamHI 片段，其如實例 D 中所述的提供四環素抗性。此粘接質體延伸不夠長無法包括 2.6kb BamHI 片段上之第二個已知的四環素抗性決定子。因此，僅回收二已知抗性決定子之一足以分離部份路徑。粘接質體純系 LP2-127 無法指令抗生素於雙鉛青鏈黴菌中之合成，因此在此純系 1.0 至 16.8 界限以外的區域，對於生合成序列之完全表現是需要的。純系也含 3.2kb SacI 片段，其用於實例 B 中以將 DMCTC 產製者修補以可產生 CTC。於此例中，於 11.6 至 14.8 位置之 3.2kb SacI 片段預期含有一個缺失的 C6-甲基化作用對偶基因，同為選殖 DNA 之來源 - 3E-2168 株、為一個 DMTC/DMCTC 產製者。

#### F. 均質化 TC 產製者以產生 DMTC

利用前一實例所述之方法，以均質化 TC-產製性金黴素鏈黴菌菌株

(T377)，便可產生DMTC。實例B之資料建議於11.6至14.8位置之3.2kb SacI片段，界定一個涉及四環素C6-甲基化作用之區域。實例E的資料顯示，粘接質體純系LP2-375含有包括在此SacI片段中，部份的生合成群。由於LP2-375中之基因體嵌入子係源自DMTC/DMTC產製者，因此查覺到得自此最後粘接質體純系之3.2kb SacI片段，應含有一個缺失的C6-甲基酶對偶基因。因此欲繼代選殖3.2kb SacI片段，將之引入T377中，並篩檢均質化之衍生物。

3.2kb SacI片段繼代選殖至PIJ-486；生成的構體命名為LP2-652。T377之原生質體以此質體轉形，並如實例B所述地再生。轉形細胞集落於種子培養中生長並如實例B所述地醱酵。在8個受試轉形細胞中，發現其一(LL1740株)產生1.8克/升DMTC，但無可測及之TC或其他組份存在。為比較起見，發現摻有質體PIJ-486之T377株主要產生TC，但無可測及之DMTC。

事實上，由於發現LL1740專一地產生DMTC而非混合產物，因此推測此株已被完全均質化。為証實此推測，如實例B般修改LL1470之質體。30個硫鏈絲菌肽敏感衍生物如前文般醱酵。所有受試之分離物均專一地產生DMTC，且無可測及之TC。代表性株為LL1782，其可產生2.5克/升DMTC。此實例中所述之過程，可視為金黴素鏈黴菌有計劃的遺傳工程，以產生一個通常不見於其母株T377或其任何先者之標的抗生素結構。因此將缺失的C6-甲基化作用對偶基因有計劃地引入C7-氯化作用缺失之T377中，可產生標的之去甲基-去氫-四環素。

218893

要點

母株	由母株產生之產物	經轉形之產物	重組體細胞株	由重組體產生之產物
1E-1355	DMCTC & DNTC (0 CTC)	LL1470- SacI 片段 自 LP <sup>2</sup> 127	LL1568	~ 4克 / 升 CTC
1E-2803	如上	IE2803/ LP <sup>2</sup> 464- NcoI 片段 自 LP <sup>2</sup> 127	LL1575 & LL1578	7克 / 升 CTC
T377	TC & 痕量 TC ( < 0.02 克 / 升 )	LL1189- BamHI 片段 自 LP <sup>2</sup> 127	LL1586	6克 / 升 CTC
如上	如上	如上	LL1587	5-6克 / 升 CTC
T377	TC & 痕量 CTC (0 DMTC)	LL1740- SacI 片段 自 LP <sup>2</sup> 375	LL1782	1.8克 / 升 DMTC

縮寫 TC = 四環素 ; CTC = 金黴素 ; DMCTC = C6-去甲基 - 金黴素 ;  
DMTC = C6- 寸甲基 - 四環素