



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **239 223 A1**

4(51) C 12 Q 1/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 278 427 1	(22)	10.07.85	(44)	17.09.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Flemming, Christian, Dr. rer. nat.; Gabert, Anton, Dr. rer. nat.; Wegewitz, Brigitte, Dipl.-Biol., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung eines Adsorbens für die Zellaффinitätschromatographie
------	--

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Affinitätsadsorbens für die Zellaффinitätschromatographie von Mikroorganismen. Ziel der Erfindung ist die Herstellung eines Zelladsorbens, der die Fähigkeit hat, Mikroorganismen zu binden. Aufgabe der Erfindung ist es, eine große Anzahl von rezeptorspezifischen Proteinmolekülen auf der Oberfläche so zu binden, daß eine spezifische Bindung der Mikroorganismen ermöglicht wird. Erfindungsgemäß werden rezeptorspezifische Proteine auf der Oberfläche eines hydrophilen Trägers mit einem gasförmigen Vernetzer, wie Glutaraldehyd, vernetzt.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung eines Affinitätsadsorbens zur Zellaффinitätschromatographie von Mikroorganismen, **gekennzeichnet dadurch**, daß rezeptorspezifische Proteine auf der Oberfläche eines hydrophilen Trägers mit einem gasförmigen bifunktionellen Vernetzer vernetzt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als rezeptorspezifische Proteine Lektine, Immunglobuline oder natürliche Antikörper und als Vernetzer Glutardialdehyd verwendet werden.

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Affinitätsadsorbens für die Zellaффinitätschromatographie von Mikroorganismen und kann in der Mikrobiologie angewendet werden, beispielsweise zur Trennung, Selektion und taxonomischen Zuordnung von Mikroorganismen sowie zur Prozeßkontrolle bei Fermentationsprozessen. Sie kann in die IPK C 12 N eingeordnet werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Adsorbentien zur Zellaффinitätschromatographie auf der Basis rezeptorspezifischer Proteine, wie Lektine, Antikörper u. a., stehen kommerziell zur Verfügung oder können nach bekannten Methoden, wie sie zur Bindung von z. B. Enzymproteinen an unlösliche Träger erfolgreich genutzt werden, hergestellt werden.

Die bisher bekannten Affinitätsadsorbentien werden überwiegend zur Bindung tierischer Zellen eingesetzt, wobei die Fraktionierung von Lymphozyten eine zentrale Stellung beansprucht.

Untersuchungen haben ergeben, daß die bekannten Adsorbentien zur Bindung von Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen u. a., nicht geeignet sind, da zwischen den betreffenden Zellen und den Adsorbentien die erforderlichen Bindungskräfte nicht wirksam werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Zellaффinitätsadsorbens zu entwickeln, das in der Lage ist, Mikroorganismen zu binden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Zellaффinitätsadsorbens herzustellen, bei dem eine hohe Anzahl von rezeptorspezifischen Proteinmolekülen auf der Oberfläche so gebunden ist, daß durch ausreichende starke Wechselwirkungskräfte eine spezifische Bindung der Mikroorganismenzellen möglich wird.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß rezeptorspezifische Proteine auf der Oberfläche eines hydrophilen Trägers mit einem gasförmigen bifunktionellen Vernetzer vernetzt werden. Als rezeptorspezifische Proteine können Lektine, bzw. Immunglobuline und als Vernetzer Glutardialdehyd eingesetzt werden. Dabei wird das gesamte oder nahezu gesamte Protein auf der Oberfläche oder der Oberfläche nahen Regionen des Trägers immobilisiert. Es wird eine solche hohe Dichte des immobilisierten Liganden an der Trägeroberfläche erreicht, die die liospezifische Bindung von Mikroorganismen ermöglicht. Dieses Verfahren unterscheidet sich von anderen Immobilisierungsmethoden, bei denen grundsätzlich in der wäßrigen Phase gearbeitet wird, wobei durch die Löslichkeit der zu vernetzenden Proteine ein Teil derselben wieder gelöst wird.

Anschließend kommt das hergestellte Affinitätsadsorbens zur Inaktivierung des überschüssigen Glutardialdehyds in eine geeignete Pufferlösung. Die weitere Arbeitstechnik zur spezifischen Zellbindung bzw. Abtrennung unterscheidet sich nicht mehr von der aus der Literatur bekannten. Ein Zellgemisch wird mit dem Affinitätsadsorbens inkubiert und nach vorsichtigem Waschen läßt sich, z. B. durch mikroskopische Kontrolle, zeigen, daß an dem Affinitätsadsorbens nur die Zellen gebunden sind, die auch mit dem gelösten rezeptorspezifischen Protein reagieren.

Die erfindungsgemäße Lösung hat den Vorteil, daß im Vergleich zur für die Immobilisierung von Enzymen üblichen Technik mit relativ gering konzentrierten Lösungen rezeptorspezifischer Proteine gearbeitet werden kann, da eine gleichzeitige Anreicherung des zu immobilisierenden rezeptorspezifischen Proteins an der Trägeroberfläche erfolgt.

Die Erfindung kann beispielsweise zur Trennung und Selektion von Mikroorganismen verschiedener Gattungen, Arten oder Stämme zur Isolierung von Zellwandmutanten von Mikroorganismen, zur Prozeßkontrolle bei technischen Fermentationsprozessen sowie in der medizinischen Mikrobiologie eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

40 ml einer verdünnten Lösung natürlicher Antikörper gegen *Candida maltosa* EH 15, isoliert aus Schweinenormalserum an einer *Candida maltosa* EH 15-Zellsäule, wurden durch eine Ultrafiltrationszelle gedrückt. Die durch die Membran gedrückte Lösung zeigte keinerlei Agglutinineinwirkung mehr auf Hefezellsuspensionen, während dessen die Ausgangslösung *Candida maltosa* EH 15 Zellen deutlich agglutinierte.

Als Membranen wurden XM 50 (Amicon) bzw. UF 3 (Wittenberge) verwendet.

Nach dem vollständigen Durchsaugen der Antikörperlösung wird die noch feuchte Membran aus der Ultrafiltrationszelle herausgenommen und in eine feuchte Kammer über 5%ige Glutaraldehydlösung eingebracht. Die Membran verbleibt bis zum Vernetzen des Proteins ca. 20 Std. bei Raumtemperatur in dieser feuchten Kammer. Anschließend wird das nicht vernetzte Protein durch Waschen mit PBS entfernt und die evtl. vom Glutaraldehyd verbliebenen reaktiven Gruppen durch Waschen mit Tris-Puffer entfernt, danach wird die Membran wieder in PBS gebracht. Die so präparierte Membran mit den an ihrer Oberfläche vernetzten natürlichen Antikörper gegen *Candida maltosa* EH 15-Zellen soll zur selektiven Anlagerung von *Candida maltosa* EH 15-Zellen aus einem Zellgemisch mit *Lodderomyces elongisporus* EH 70 verwendet werden.

Beide Hefestämme wurden unter identischen Bedingungen im Schüttelkolben kultiviert. Zur späteren Unterscheidung wurde *Lodderomyces elongisporus* EH 70 mit Coomassie blau G 250 angefärbt. Das Kontrollexperiment bewies, daß durch diese Art der Anfärbung die Wechselwirkung Antikörper-Hefezellen nicht beeinträchtigt wird. *Candida maltosa* EH 15 wurde unangefärbt verwendet. Beide Hefestämme wurden danach im Verhältnis 1:1 gemischt, 6 ml Suspension dieses Zellgemisches (10^9 Zellen/ml) werden auf die Membran aufgegeben. Unter leichtem Schwenken wird 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Um die nicht gebundenen Zellen zu entfernen, wird die Membran vorsichtig mit Wasser abgespült. Die anschließende mikroskopische Betrachtung zeigt folgendes Bild. Bis auf ganz vereinzelte blau gefärbte *Lodderomyces elongisporus* EH 70-Zellen, sind massenhaft nur ungefärbte *Candida maltosa* EH 15-Zellen auf der Membranoberfläche zu finden.

So werden aus dem Zellgemisch die nicht angefärbten *Candida maltosa* EH 15-Zellen von ihrem homologen Antikörper eindeutig bevorzugt gebunden.

Beispiel 2

Ein Objektträger wird mit 0,5 ml wäßrigem 3%igem Agar überzogen, in die Mitte des Objektträgers werden 0,05 ml einer Lösung von Ricinus-Lektin (RCA) (5 mg/l) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 als Tropfen aufgetragen. Bei Zimmertemperatur ist die überstehende Flüssigkeit etwa nach 10 Min. in den Agar eindiffundiert bzw. verdunstet. Der so präparierte Objektträger kommt nun in eine Petrischale deren Boden mit 5%igen Glutaraldehyd bedeckt ist und verbleibt dort 20 h bei Zimmertemperatur, ohne daß eine direkte Berührung des Objektträgers durch das wäßrige Glutaraldehyd erfolgt. Das Lektin wird an der Auftragsstelle durch das gasförmige Glutaraldehyd vernetzt. Das so präparierte Affinitätsadsorbens kommt anschließend 2 h in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,2.

Zur Zelltrennung wird ein Gemisch der Hefestämme *Candida maltosa* EH 15 und *Yarrowia lipolytica* EH 59 eingesetzt. Zur mikroskopischen Unterscheidung werden die Zellen des Stammes *Yarrowia lipolytica* mit Serva-Blau angefärbt. Der Objektträger mit dem immobilisiertem Lektin wird mit 1 ml der konzentrierten Mischung der Zellsuspension überschichtet und während 10 Min. leicht bewegt, anschließend mit Wasser vorsichtig abgespült.

An der Stelle, an der das Ricinuslektin auf den Objektträger vernetzt wurde, sind die blauen Zellen von *Yarrowia lipolytica* in dichter Anordnung gebunden.

Beispiel 3

Es wird wie in Beispiel 2 beschrieben gearbeitet, als Lektin wird Linsen-Lektin und als Träger statt Agaron ein Stück Dialysierschlauch verwendet. Getrennt wird das gleiche Gemisch aus *Candida maltosa* und blau gefärbter *Yarrowia lipolytica*. In diesem Fall werden durch das immobilisierte Lektin nur die ungefärbten Zellen von *Candida maltosa* gebunden.