



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/00

C12N 9/10

C12N 1/20

C12P 19/34

[11] CN 87 1 06979 A

CN 87 1 06979 A

[43]公开日 1988年7月6日

[21]申请号 87 1 06979

[22]申请日 87.10.19

[30]优先权

[32]86.10.20 [33]DE [31]P3635583.6

[71]申请人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国美因河畔法兰克福

[72]发明人 鲁迪格·马奎亚特 保罗·普拉夫

卡尔·埃琴 尤尔夫·斯塔尔

厄恩斯特·鲁德威格·温纳纳克

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
代理部

代理人 李 瑛 顾柏棣

[54]发明名称 在甲基营养性微生物中复制的杂交质粒及其制备方法

[57]摘要

限制性酶 NotI 用于从 *Methylomonas Clara* pSM2 397 质粒 pBE3 中分离并图示一个相关于复制起点的区域。将这个复制区域与任何其它所需质粒连接可得到杂交质粒,此杂交质粒能在甲基营养性细菌中稳定复制。

881A03807 / 02-191

1. 一种制备具有  $\rho$ BE3 片段的杂交质粒的方法, 该片段负责在 *Methylomonas Clara* 中复制。该方法包括将所述的  $\rho$ BE3 质粒片段与一具有选择标志的质粒相连接。

2. 一种制备一段具有质粒  $\rho$ BE3 复制起点的 DNA 片段的方法, 该方法包括用 *NotI* 完全消化  $\rho$ BE3, 并分离最长的 2.3 MD 片段。

3. 权利要求 1 所述的方法, 其中  $\rho$ BE3 片段是一 2.3 MD 的 *NotI* 片段。

4. 权利要求 1 所述方法, 其中所述  $\rho$ BE3 质粒片段与  $\rho$ BR322 连接。

5. 权利要求 1 所述方法, 其中所述  $\rho$ BE3 质粒片段与  $\rho$ RM 质粒连接。

6. 权利要求 1 所述方法, 其中所述  $\rho$ BE3 质粒片段与  $\rho$ RM4 连接。

7. 权利要求 6 所述方法, 其中得到的杂交质粒  $\rho$ RM4 - *Notori* 用 *PvuI* 完全切割, 限制性混合物用连接酶处理, 消化所得的最大片段为 4.82 MD, 作为质粒而得到分离。

8. 采用具有一段负责在 *Methylomonas Clara* 中复制的  $\rho$ BE3 片段的杂交质粒为甲基营养性细菌构造表达质粒。

9. 采用权利要求 8 所述杂交质粒为 *Methylomonas Clara* 构造表达载体。

10. 采用权利要求9所述杂交质粒为 *Methylobacterium* *Clara* 中芳香族转氨酶构造表达质粒。

11. 用权利要求1所述方法所能得到的杂交质粒。

在甲基营养性微生物中复制  
的杂交质粒及其制备方法

在欧洲专利申请 0 0 9 8 9 6 7 中叙述了表达外源 DNA 的专性甲基营养性细菌及质粒和宿主生物的制备方法。该方法包括将得自专性甲基营养细菌的质粒与一种大肠杆菌的载体连接产生一种杂交质粒，该杂交质粒进而能通过偶联转移至甲基营养性细菌。

然而，一种得自专性甲基营养性细菌 *Methylomonas Clara*, DSM 2 3 9 7 的适当质粒  $\rho$  B E 3，具有较大尺寸，分子量为 1 0 M D。为便于控制，须将此质粒切为片段。但这是很困难的，因为该质粒只有很少或几乎没有能识别六位顺序的酶的切点（欧洲专利 A 0 0 9 8 9 6 7）。

但意外的是，质粒  $\rho$  B E 3 能被限制性酶 *N o t I* 切成至少 9 片段，该酶识别一段八位顺序。可以证明，在 *M. Clara* 中复制所需的并且是足够的信息位于这些 *N o t I* 片段中最长的一段上。此片段或者插入同样具有 *N o t I* 切点的载体，或者经用其它酶消化而从特定杂交质粒中得到该片段的方法修饰后，再插入具有适当切点的载体。

因此，本发明涉及到：

1. 具有一个  $\rho$  B E 3 片段的杂交质粒，该片段在 *Methylomonas Clara* 中负责复制。

2. 制备项目 1 中规定的杂交质粒的方法，包括将来自  $\rho$  B E 3 的质粒片段与具有选择标志的质粒相连接。

3. 使用项目 1 规定的杂交质粒，为甲基营养性细菌构造载体。

在下面，特别是它的优选的实例中详细说明了本发明，并在权利要求书中加以限定。

形成具有一个  $N \circ t$  I 切点的杂交质粒的一个优选方法是将具有  $N \circ t$  I 切点的一段  $E \circ \circ$  RI 片段（优选为质粒  $pBE3$  中长度居第四位的  $E \circ \circ$  RI 片段）克隆至具有选择标志的质粒  $E \circ \circ$  RI 切点。

具有选择标志的始质粒中优选为  $pBR 322$ ，它不含  $N \circ t$  I 切点。以此方法得到  $pRM$  质粒，在优选实例中得到  $PBM4$  质粒。

在  $pBE3$ （其中  $pBE3$  已用  $N \circ t$  I 切割）及  $pRM$  质粒（尤其是  $pRM4$ ）连接完成后，进行竞争宿主细胞（如大肠杆菌）转化，通过选择有可能发现含有具多种  $N \circ t$  I 片段的杂交质粒的细胞。

将这些质粒插入偶联体系，从例如大肠杆菌转移至 *M. Clara*（优选体系如欧洲专利申请 0098967 所述）。就有可能证实哪个  $N \circ t$  I 片段含有复制所需全部信息，在所有情况下这个片段总是最长的一条。相应的杂交质粒称为  $pRM - Notori$ ，优选杂交质粒称为  $pRM4 - Notori$ 。

在本发明的深入说明中，将借助优选采用的杂交质粒  $pRM4 - Notori$  来描述方法。然而也可类似地采用其它  $pRM - Notori$  质粒。为此所需的适当的条件可在简单的初步检测中确定。

为再缩小尺寸，用限制性酶  $Pvu$  I 处理质粒  $pRM4 - Notori$ ， $pRM4 - Notori$  含两个  $Pvu$  I 切点。一个位于

该质粒的  $\rho$ BR322 部分，另一个位于  $\rho$ BE3 部分，但处于复制必需的 *Not* I 片段之外。因此，用 *Pvu* I 消化质粒  $\rho$ RM4-*Notori* 的结果是得到两个片段，其中较长的片段具有在 *M.*

*Clara* 和大肠杆菌中复制所需全部功能，及一种功能性四环素-抗性基因。随后用连接酶处理该限制性酶切混合物，从两个 *Pvu* I 片段中较长者得到质粒  $\rho$ SE1。

该质粒借助于一连接体系可转移至甲基营养性细菌如 *Methylobacterium* *Clara* 中，甚至在非选择条件下也能在此微生物中保持稳定数代。

有可能借助  $\rho$ SE1 和具有多连接点的质粒如  $\rho$ UC12 来修饰 *Not* I 片段的末端，该片段携有复制起点，修饰后使具有复制起点的  $\rho$ BE3 片段再不受 *Not* I 切点的限制，而受其它限制性切点的联合限制。此外还有可能将合成制备的短 DNA 顺序加于携带复制起点的 *Not* I 片段的两边，或通过将 *Not* I 片段与  $\rho$ UC12 以外的多连接点顺序相连来修饰 *Not* I 片段。以此方法产生的杂交质粒如  $\rho$ UC12-*Notori*，使携带复制起点的  $\rho$ BE3 片段能用多种限制性酶得到，并转移至任何其它所需质粒，这些质粒将在甲基营养性细菌，特别是 *Methylobacterium* *Clara* 中复制。

为用欧洲专利申请 0098967 中所述体系，转移含有质粒  $\rho$ BE3 复制起点的任何所需杂交质粒至 *M. Clara*，需要在有关质粒中出现一段 DNA 顺序，称为“流动基础”（*boom*）。此 DNA 顺序也可出现在质粒  $\rho$ BR322。其位置已确切知道，于质粒  $\rho$ BR322 的长度居第二位的 *Hae* III 片段上。可用上述类似的方法处理该质粒，使之能用多种限制性酶得自适当杂交质粒。

借助于如此构造的“起点”或“bom”DNA顺序，可用下述方法转化任何所需表达质粒，即使它们能被转移至甲基营养性细菌，特别是Methylobionas Glara，并能在那里稳定复制。为此目的，首先用一些适当的限制性酶提取起点DNA片段，例如，从质粒pUC12-Notori中提取，并将该片段结合于一表达载体。如果对于转移至适当甲基营养性细菌为必需的bom区未出现于该表达载体，则在第二步中用适当限制性酶自例如质粒pUC12-bom中提取携有bom区的DNA片段，同样转移至该质粒。以此方式，可对任何所需基因产物编码，转移至甲基营养性细菌，并通过发酵得到相应基因产物。

以此方式能够，例如，将芳香族转氨酶基因引入Methylobionas Glara。例如，从质粒pIMS4004开始，该质粒由载体pBR322衍生得到，其中一段4.5 kb长的Ola I片段，来自整个大肠杆菌 k12 DNA，被克隆入pBR322的唯一Ola I切点。这段长为4.5 kb的Ola I片段携有编码来自大肠杆菌 k12的芳香族转氨酶的tyr B基因。该基因并不覆盖整个4.5 kb区域，但位于一段由一个Ola I切点和一个Hind III切点限制的DNA区域之内。因此，如果用Hind III切质粒pIMS4004，则位于Ola I片段上的4.5 kb长的切点及位于pBR322部分的Hind III切点形成一长片段，在大Hind III片段再环化后，此片段能被删除而不破坏tyr B基因。得到的质粒只含有一个Hind III和一个Sal I切点，它们都位于质粒的pBR322部分。由于此质粒来自pBR322，它具有转移至甲基营养性细菌必需的bom顺序，一功能性

且良好表达的 *tyrB* 基因，及氨基青霉素抗性基因用于筛选。但在该质粒中不出现允许其在甲基营养性细菌中复制的 DNA 顺序。为插入这段顺序，该质粒用酶 *Hind* III 和 *Sal* I 完全消化，正如质粒 *pUC12-Notori* 被完全消化一样，以此方法，从此质粒中提取出携有甲基营养性细菌中的复制起点的 DNA 顺序。此外质粒 *pUC12-Notori* 也用限制性酶 *Pvu* I 消化以防止来自 *pUC12-Notori* 的 *Hind* III / *Sal* I 片段重新连接至始载体上，将所需基因连接至一质粒后，即可用于欧洲专利申请中叙述的连接体系中，并转移至专性甲基营养性细菌 *M. Clara* 菌株中，通过微溶选择的克隆，然后用限制性酶消化所分离的质粒，有可能保证要转移的 DNA 已以不变形式插入受体菌株 *M. Clara*，在那里该 DNA 保持稳定。

以下将以实例进一步说明本发明。

### 实例

在实例的附录中，用限制性酶切图在图 1 中表示出质粒 *pRM4* 和 *pRM4-Notori*，在图 2 中表示出质粒 *pSE1* 和 *pUC12-Notori*。只标示出本发明所必需的切点。长度数据单位为 MD。

#### 1. 构造 *pRM4-Notori* 和 *pSE1*

用限制性酶 *Not* I 完全消化质粒 *pRM4*。然后用苯酚处理移去核酸内切酶 *Not* I，用乙醇沉淀 DNA，用 70% 强度乙醇冲洗，真空干燥，然后溶解于适当体积的 Boehringer Mannheim 所述的适于碱性磷酸脂酶的缓冲液 (GIP) 中。加入 10U 碱性磷酸脂酶，37° 温育 30 分钟，用苯酚处理反应混合物移去该酶，用上述方法纯化 DNA。最后将 DNA 重新悬浮于 TE 缓冲液。

用酶 *Not* I，完全消化 *M. Clara* 质粒 *pBE3*，得到

切割为至少9段的不同长度的片段。

将一份温育混合物等分试样加入一球脂糖凝胶以检测是否消化完全。消化后用苯酶处理移去该酶，如上述方法纯化DNA，重新悬浮于TE缓冲液。

已用Not I消化的pRM4和pBE3的各种混合物按下列摩尔比配制，从2:1，1:1，至1:5。按厂家(New England Biolabs)说明将缓冲液加入所得混合物中以产生T<sub>4</sub> DNA连接酶的最佳介质。将1 μl T<sub>4</sub> DNA连接酶(Biolabs, 400 U/μl)加入该混合物，于14~16 °C下温育至少14小时，此混合物总体积50 μl。

温育后，用移液管移出10 μl连接酶混合物并于一无菌Eppendorf反应试管中，加入100 μl大肠杆菌菌株HB101感受态细胞悬浮液。采用已知方法使这些细胞能够获取外源DNA。用Cohen et al (Proc. Natl. Acad. Sci. 69(1972)2110-14)方法进行转化，在合适的选择性营养介质中分离具有氨苄青霉素抗性和四环素抗性的菌落，培养于L液体培养基中(1% Bacto 胰胨，0.5%酵母提取物，0.5% NaCl)，然后用微溶方法检测其质粒内容。

可以用酶Not I消化质粒及琼脂糖电泳来显示Not I片段从pBE3结合到pRM4上。

可以用已知方法将Not I片段1, 3, 和4从pBE3克隆至质粒pRM4。所得质粒被用于曾在欧洲专利申请0098976例10中所述的结合体系中，它们从大肠杆菌至M. Glara的转移亦有过研究。结果表明只有那种含有Not I片段1的从

$\rho$ BE3克隆至 $\rho$ RM4的质粒能发展成为四环素抗性和氨基青霉素抗性的M. Clara克隆。用微溶方法检测这些克隆中的相关质粒，该质粒称为 $\rho$ RM4-Notori。

用酶Pvu I完全切割 $\rho$ RM4-Notori，将反应混合物加热到65°C，用水和一种缓冲液稀释10  $\mu$ l该混合物，以得到总体积为100  $\mu$ l的厂家推荐的T<sub>4</sub> DNA连接酶的最适介质。加入1  $\mu$ l T<sub>4</sub> DNA连接酶(Biolabs, 400 U/ $\mu$ l)，16°C下温育该混合物16小时，然后用一份等分试样连接酶混合物转化大肠杆菌菌株HB101感受态细胞，在适当的选择性培养皿(L液体培养基，含20  $\mu$ g/ml四环素)中选择四环素抗性菌落。50个四环素抗性克隆被挑选入氨基青霉素培养皿(L液体培养基含50  $\mu$ g/ml氨基青霉素)，用微溶方法从具有表现型T<sup>c</sup>YAp<sup>S</sup>的5个菌落中分离质粒DNA，并研究之。在所有情况下，该质粒现只包括质粒 $\rho$ RM4-Notori的大Pvu I片段。这些杂交质粒被称为 $\rho$ SE1。

质粒 $\rho$ SE1用于上面所述的连接体系，并被转移至无质粒甲基营养性细菌菌株M. Clara ATCC31226。所得到的四环素抗性M. Clara克隆都会以不变形式存在的所期望质粒 $\rho$ SE1。在非选择性条件下多于100代观察未发现质粒丢失。

## 2. 构造 $\rho$ UC12-Notori

用酶Not I完全消化质粒 $\rho$ SE1，所得到的突出末端在缓冲液中用DNA聚合酶I(Klenow片段)处理填充以得到钝末端，此缓冲液是根据厂家Boehringer Mannheim的推荐，其它条件亦根据厂家所述。在用苯酚处理移去酶及用乙醇沉淀纯化DNA

之后，再用限制性酶 *SaI I* 重新消化片段混合物。酶 *SaI I* 并不切割 *pBM3* 的 *Not I* 片段，但切割载体 *pRE1* 上的四环素抗性基因。

如此制备的 DNA 与已被酶 *Xba I* 完全消化的 *pUC12* DNA 混合，然后用 *Klenow* 聚合酶填充，如例 1 所叙述的那样进行连接。转化大肠杆菌菌株 *HB101* 感受态细胞之后选择氨苄青霉素抗性菌落，然后培养于 L 液体培养基，然后用微溶方法检测其质粒内容。在琼脂糖凝胶电泳中质粒 DNA 与质粒 *pUC12* 相比表现出尺寸增大，可用 *EcoRI* 消化以详细鉴定。这样做能够识别那些含有质粒 *pUC12* 的克隆，这些 *pUC12* 质粒具有克隆入填充 *Xba I* 切点的 *M. Clara* 质粒 *pBE3* 的填充 *Not I* 片段 1。分离出这个片段的两种可能取向，从这些质粒中可得到对于在 *M. Clara* 中复制为必需的质粒 *pBE3* 的大量区域，并通过结合限制性酶 *Sst I*，*Sma I*，*BamHI* 和 *SaI I*，*Pst I* 和 *Hind III* 的作用，可分离出这些区域。

### 3. 构造 *pUC12-bom*

市场可得的 *pUC12*，用酶 *Xba I* 完全消化，形成的突出末端用 DNA 聚合酶 I (*Klenow* 片段) 填充。用酶 *Hae III* 完全消化质粒 *pBR322*，得到具有钝末端的 22 片段。可以将这些片段中最长的一段用琼脂糖凝胶电泳方法分离得到。在电泳过程中于紫外灯下相距一定时间检测凝胶以观察片段间的相互分离，由于在琼脂糖凝胶中含有荧光染料溴乙锭，DNA 片段可被观察到。

当这些片段已彼此分离足够远后，含有长度居第二位的 *pBR322 Hae III* 片段的凝胶条用刀片从凝胶上割下并转移至一透析

试管。向试管中加入缓冲液[89 mmol/l Tris, 89 mmol/l 硼酸, 2.5 mmol/l EDTA (pH 8.2)]至浸没凝胶条, 试管固定于一电泳小室以同种缓冲液进行电洗脱, 洗脱在100V下持续至少12小时, 然后将正负极颠倒, 再洗脱5分钟。缓冲液从透析试管转至一塑料容器, 在紫外灯下检测琼脂糖胶条以确信所有DNA均已被从该条上洗脱下来。缓冲液用苯酚萃取至少两次, 将水相合并, 进行乙醇沉淀, 用70%强度乙醇洗涤产物至少3次。真空干燥DNA, 溶于适当体积TE缓冲液, 一份等分试样与pUC12 DNA(其已按上述方法制备)混合并结合。转化了的大肠杆菌克隆于含50 μg/ml 氨苄青霉素的L液体培养基中选出, 用微溶法从中分离得到的质粒DNA以琼脂糖凝胶电泳方法检测其尺寸的增加。

以此方法可识别这样的克隆, 其中来自pBR322的bom DNA段以两种方向被克隆。

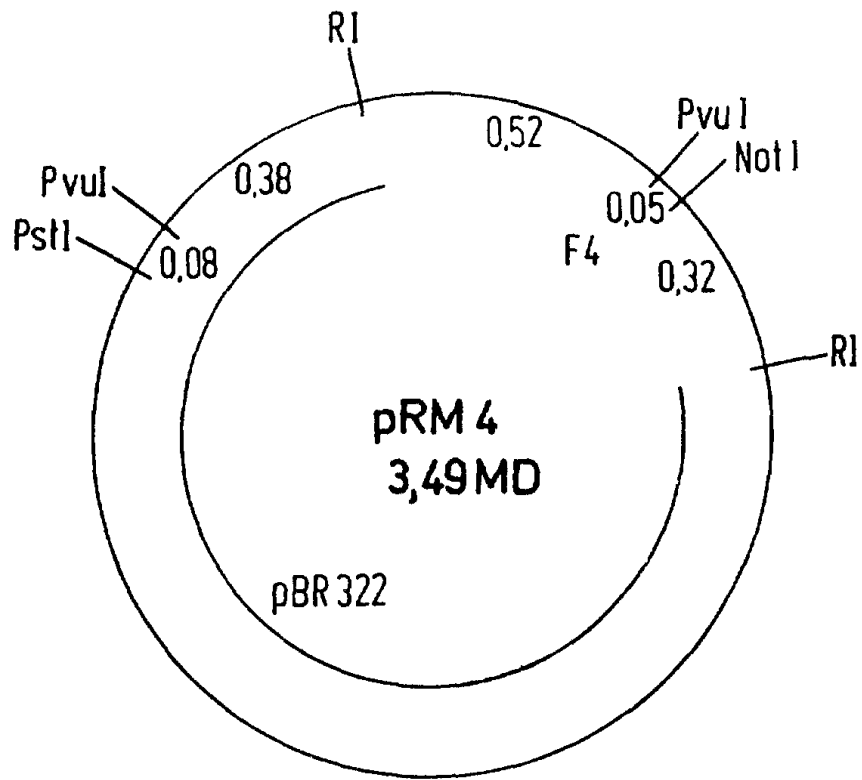


图 1

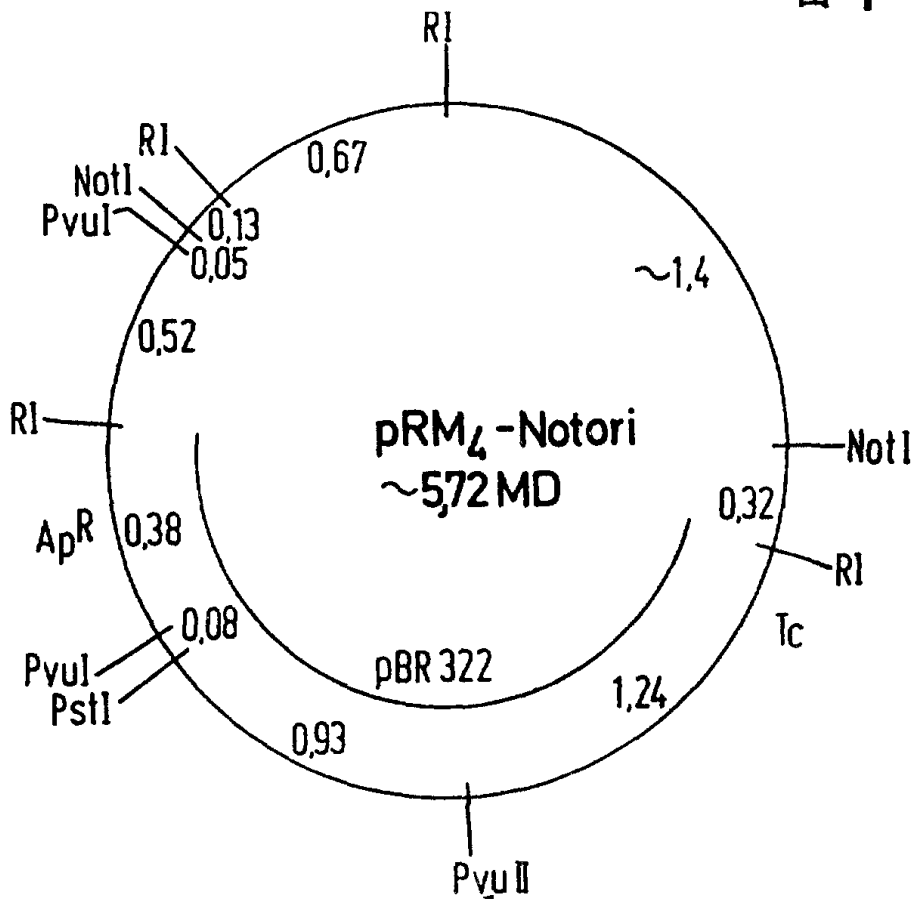


图 2

