



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 148 236

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

				Int. Cl. ³
(11)	148 236	(44)	13.05.81	3(51) C 12 N 15/00
(21)	AP C 12 K / 216 297	(22)	17.10.79	
(31)	953 573	(32)	23.10.78	(33) US

(71) siehe (73)

(72) Wovcha, Merle G.; Brooks, Kevin E., US

(73) The Upjohn Company, Kalamazoo, US

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, 1130 Berlin, Frankfurter Allee 286

(54) Verfahren zur Herstellung eines genetischen Elementes

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung des Enzymes Glucose-isomerase beschrieben, indem man einen Wirtsorganismus züchtet, welcher ein geeignetes Überträgermaterial enthält, welches ein Gen für Glucose-isomerase aufweist. Dieses Verfahren ergibt eine hohe Ausbeute an Glucose-isomerase, welche ein wertvolles Enzym bei der Herstellung von Fructose ist.

Verfahren zur Herstellung von Glucose-isomerase.

Glucose-isomerase ist ein wertvolles Enzym für die Herstellung von Fructose. Früher wurde die alkalische Isomerisierung von Glucose versucht, aber dies war in einem kommerziellen Masstab nicht möglich aufgrund der mangelnden Selektivität. Dieser Nachteil bezüglich der Selektivität bewirkte auch die Herstellung von nicht-biologisch abbaubaren Materialien wie zum Beispiel Psikose und ebenso von unerwünscht gefärbten Materialien, welche nur unter Kostenaufwand zu entfernen waren.

In der Folge wurde die mikrobiologische Produktion von Glucose-isomerase entwickelt, und diese erreichte bereits wirtschaftliche Bedeutung. Mikroorganismen welche dafür verwendet wurden sind diejenigen der Stämme Lactobacillus, Pseudomonas, Pasteurella, Leuconostoc, Streptomyces, Aerobacter und Arthrobacter. Siehe dazu die U.S. Patentschrift Nr. 3,645,848. Diese mikrobiologischen Prozesse zur Herstellung von Glucose-isomerase erreichen ihr Ziel durch Anwendung von Mikroben, welche ein Glucose-isomerase-gen als ein in den Chromosomen anwesendes Gen aufweisen.

Die DNA-Rekombinationsmethode, die weiter unten näher beschrieben wird, wurde angewandt um ein genetisches Element zu konstruieren, welches die Codierung für ein Glucose-isomerase-enzym aufweist. Dieses genetische Element wurde sodann in ein Wirtsbakterium eingebracht, und bei der Kultivierung wurden wesentlich grössere Mengen an Glucose-isomerase produziert als das bisher beim Donorstamm möglich war. So weit es uns bekannt ist, ist dies das erste Mal dass ein derartiges unzweideutiges Resultat erzielt worden ist.

Rekombinierte Plasmiden, welche das Gen für das Enzym Xylose (Glucose) -isomerase tragen, wurden aufgebaut, indem man lineare DNA-Fragmente der Ligaturbildung unterwarf, welche durch Hind-III teilweisen Abbau von pMB9 DNA (die Replika) herstellte und eine vollständige Escherichia coli K12 DNA (die Quelle des Isomerase-genes) anwandte. Das Wirtsbakterium war ebenso ein E. coli K12 Stamm (Stamm JC1553), welcher einen Defekt bezüglich des Enzymes Xylose (Glucose)-isomerase aufwies, und welcher durch die Rekombinationsplasmiden vom Phenotyp Xyl^-Tc^S in den Phenotyp Xyl^+Tc^R übergeführt wurde. Die Auswahl bezüglich des geclonten Bakteriums, welches das erwünschte Rekombinationsplasmid trägt, wurde aufgrund folgender Tatsachen vorgenommen:

- (1) Das Plasmid pMB9 trägt eine Codierung für eine Resistenz gegenüber dem Medikament Tetracyclin (Tc), und
- (2) der Empfänger, nämlich der E. coli Stamm JC1553 weist eine Mutation im Xylose-isomerase-gen auf, und kann dementsprechend auf diesem Substrat nicht wachsen. Dieser Stamm kann ebenso auch nicht Glucose isomerisieren, weil das gleiche System beide Reaktionen ausführt. Jedoch kann der Stamm JC1553 normal auf Glucose wachsen, weil im Unterschied zur Xylose der Hauptanteil des Stoffwechselcyclus für die Verwendung von Glucose dieses Enzym nicht benötigt. Xylose-induzierte Zellen, welche das Rekombinationsplasmid pUC1002 aufweisen, zeigen eine Verstärkung der Glucose-isomerase-Aktivität von mehr als 500 % relativ zu dem Wert der vom Donorstamm gezeigt wird.

Es sei festgehalten, dass das Glucose-isomerase-gen, welches in der Natur vorkommt, ein Chromosomengen ist wobei dieses Gen nur einmal pro Chromosom vorkommt. Andererseits wird das erfindungsgemässe Glucose-isomerase-gen in einen Plasmid eingebracht welcher im Wirtsorganismus vielfach vorkommt. Diese Einführung des Gens in ein Plasmid oder in einen anderen geeigneten Träger wie er hier definiert ist

bewirkt eine Verstärkung der Genaktivität und des erwünschten Genproduktes, d.h. der Glucose-isomerase.

Die beiliegende Zeichnung veranschaulicht die Prozess-schritte zur Herstellung des rekombinierten Plasmides welches die E. coli Gene trägt, welche die Codierung für die Produktion des Enzymes Glucose-isomerase tragen. Obwohl die Abkürzungen, die verwendet werden, üblich sind und dem Fachmann gut bekannt sind werden sie hier nochmals definiert, um ein klares Verständnis der Erfindung zu gewährleisten.

HindIII, EcoRI, BamHI, Sall, HpaI -

bedeuten die Einschränkung von Endonuclease Spaltpositionen.

Tc - bedeutet die Gencodierung für die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin.

AGCT - ist ein einkettiges DNA-Fragment, welches die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin enthält.

T4 DNA Ligase -

bedeutet ein Enzym, welches bezüglich des bakterio-phagen T4 codiert ist, und welches die kovalente Verbindung von Polydeoxynucleotiden katalysiert.

Xyl - bedeutet Xylose.

pMB9 - bedeutet einen nicht übertragbaren autonom replizierenden E. coli Plasmid.

Die E. coli Stämme, die hier beschrieben werden, einschliesslich derjenigen welche derartige Plasmide enthalten wurden in der permanenten Sammlung des "Agricultural Research Service, Culture Collection Northern Regional Research Laboratory (ARS = NRRL), Peoria, Illinois 61604-USA hinterlegt. Ihre Identifikationsnummern in dieser Sammelstelle sind die folgenden:

JC1553	- NRRL B-11391
K37	- NRRL B-11392
HB129 (pMB9)	- NRRL B-11390
JC1553 (pUC*1002)	- NRRL B-11393

* pUC ist die offizielle Bezeichnung für ein Plasmid das der Upjohn Company gehört.

Diese Hinterlegungen sind von der Sammelstelle erhältlich sobald ein Patent erteilt wird, in welchem diese geoffenbart werden. Es sei festgehalten, dass die Erhältlichkeit einer Hinterlegung nicht eine Lizenz darstellt um die vorliegende Erfindung auszuführen unter Umgehung der Patentrechte, welche für diesen Fall durch amtliche Anordnung gewährleistet werden.

Die Erfindung sei nun anhand der Beispiele näher erläutert, welche bevorzugte Ausführungsformen dieser Erfindung beschreiben und durchaus nicht den gesamten Erfindungsgedanken umfassen. Alle Prozentsätze sind Gewichtsprozentsätze und alle Lösungsmittel-mischungsanteile sind Volumenanteile wenn dies nicht anders angegeben ist.

Beispiel 1: Herstellung von DNA

E. coli K37 Chromosomen DNA wird isoliert, wie dies von Marmur [J. Mol. Biol. 3: 203-218 (1961)] beschrieben wird. Die Kultur wird in einer L-Nährlösung (Lennox, E.S. (1955) Virology 1: 190-206) unter heftigem Rühren bei 37°C wachsen gelassen, bis die optische Dichte bei 590 nm 0,8 erreicht. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 10,000 g während 10 Minuten geerntet, und man wäscht 1-mal mit kalter, 50 millimolarer Tris-HCl, pH 8,0, 20 mMol EDTA und suspendiert anschliessend wieder in einem Fünftel des Volumens des gleichen Puffers. Die Zellauflösung wird bewirkt

durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat bis zu einer endgültigen Konzentration von 1,5 % und anschliessendem Erwärmen auf 60°C während 10 Minuten. Die so erhaltene viskose Lösung wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und sodann wird Natriumperchlorat bis zu einer endgültigen Konzentration von 1 Mol zugegeben. Die gesamte Mischung wird sodann mit einem gleichen Volumen Chloroform-isoamyl-alkohol (24 : 1, Volumen/Volumen) während 20 Minuten geschüttelt. Die so erhaltene Emulsion wird in drei Schichten aufgetrennt, indem man 5 Minuten bei 10,000 g zentrifugiert. Die obere Schicht, welche die DNA enthält, wird in einen schmalen Kolben übergeführt und mit 2 Volumina kaltem, 95-prozentigem Aethanol überschichtet. Die DNA wird sodann auf einen Glasstab aufgewickelt, indem man leicht rührt. Die abgeschiedene DNA wird in 15 mMol Natriumchlorid, 1,5 mMol Trinatriumcitrat gelöst, und die Deproteinisierung wird wie oben wiederholt bis wenig oder kein Protein an der Grenzfläche nach der Zentrifugation erscheint. Schliesslich wird die gereinigte DNA in 15 mMol Natriumchlorid, 1,5 mMol Trinatriumcitrat und 0,5 mMol EDTA gelöst.

pMB9 Plasmid DNA wird aus *E. coli* HB129 isoliert, welche wie oben in einer L-Nährlösung gezüchtet wurden, welche mit Tetracyclin mit einem Gehalt von 25 µg/ml angereichert war. Die rohen Lysate wurden hergestellt, indem man die Zellen resuspendierte, und zwar in 1/10 des Volumens an 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA und 500 µg predigestierte (90 Minuten bei 37°C) Pronase (Calbiochem, La Jolla, Calif.) und 1 % Natriumdodecylsulfat und sie bei 37°C inkubierte bis die Suspension sich geklärt hatte. Chromosomen DNA wird sodann abgezogen, indem man die Lysate durch eine Nadel von 13 Gauge hindurchzog und die Plasmid DNA wird isoliert, indem man Gleichgewichtszentrifugation (Spinco 50 Ti Rotor, 15°, 40,000 rpm, 48 - 60 Std.) der abgezogenen Lysate in Cäsiumchlorid-ethidium-bromid Dichtegradienten ausführte. Die Plasmid DNA wird entfernt, indem man Fraktio-

nen sammelte und zwar mittels Anstechen mit einer Nadel vom Boden des Gradienten. Fraktionen, welche die Plasmid DNA enthielten wurden vereinigt und man extrahierte dreimal mit gleichen Volumina Isoamylalkohol um das Ethidiumbromid zu extrahieren. Die DNA-Lösung wurde sodann gegen 15 millimolares Natriumchlorid, 1,5 millimolares Trinatriumcitrat und 0,5 millimolares EDTA dialysiert, mit Aethanol abgeschieden und schliesslich in einem kleinen Volumen des obigen Puffers gelöst.

Beispiel 2: Restriktions-endonuclease-Abbau.

Die HindIII-Spaltung einer Mischung aus E. coli K37 und pMB9 DNA (3:1), wie sie in Beispiel 1 beschrieben wurde, wird ausgeführt indem man eine Reaktionsmischung anwandte, welche 7 mMol Tris·HCl, pH 7,9; 7 mMol Magnesiumchlorid, 60 mMol Natriumchlorid, 100 µg/ml autoklaviertes Gelatine und eine Einheit HindIII Endonuclease/µg DNA enthielt. Nach Inkubation bei 37°C während 60 Minuten wird die Reaktion abgestoppt, indem man während 5 Minuten auf 65°C erwärmt.

Beispiel 3: T4 DNA Ligase Reaktion.

Die abgestoppte Reaktionsmischung aus dem obigen Beispiel 2 wird mit Material ergänzt, das eine endgültige Konzentration von 5 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Dithioerythrit, 50 µM ATP und eine Einheit T4 DNA Ligase/µg von DNA vorhanden war. Die Reaktionsmischung wird bei 0°C während etwa 16 Stunden inkubiert.

Beispiel 4: Umwandlung von E. coli.

Die Umwandlung von E. coli JC1553 mittels Plasmid DNA wird ausgeführt, wie dies von Cohen et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114 (1972)] beschrieben wurde. 100 ml L-Nährlösung wurden mit JC1553, NRRL B-11391 angeimpft, und man züchtete bis zu einer optischen Dichte von 0,85 bei 590 nm. Die Zellen wurden sodann eingefroren, sedimentiert und mit dem halben Volumen an kalter, 10 millimolarer Natriumchloridlösung gewaschen. Nach der Zentrifugation werden die Zellen im halben Volumen kalter 0,03 molarer Calciumchloridlösung resuspendiert und bei 0°C während 20 Minuten belassen, sodann sedimentiert und in 1/10 des anfänglichen Volumens an 0,03 molarer Calciumchloridlösung resuspendiert. Sodann wurden 0,2 ml dieser Zellen mit 0,1 ml Ligations-DNA-Reaktionsmischung vermischt, welche vorhergehend mit Calciumchlorid angereichert wurde, sodann eine Konzentration von 0,03 molar bestand. Die so erhaltene Suspension wird während 60 Minuten bei 0°C gehalten und sodann einer schockartigen Erhitzung während kurzer Zeit auf 42°C unterworfen. Schliesslich werden die Zellen 10-fach in L-Nährlösung verdünnt und bei 37°C unter heftigem Rühren während 2 - 4 Stunden inkubiert um die Drogenresistenz ausbilden zu lassen, und sodann wurden sie in Petrischalen auf ein Medium, welches minimale Salzmengen enthielt, aufgebracht welche Xylose als einzige Quelle für Kohlenstoff und Energie enthielt und darüber hinaus Tetracyclin in einer Menge von 5 ug/ml. Die Züchtung auf diesem Medium erlaubt die Unterscheidung der Transformate (bzw. umgewandelten, bzw. gekonten Zellen), welche die erwünschten genetischen Elementrekombinationen aus JC1553 (welche nicht in Gegenwart von Tetracyclin oder unter Anwendung von Xylose als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet werden können) und von JC1553 welche intakte pMB9 tragen (welche in Gegenwart von Tetracyclin wachsen, jedoch ebenfalls nicht Xylose als

einzigste Quelle für Kohlenstoff und Energie nutzen können).

Beispiel 5: Glucose-isomerase-Aktivität in rohen
 Extrakten von JC1553 (pUC1002)

100 ml Portionen von Fraser's Medium (Fraser, D. und E.A. Jerrel, 1953, J. Biol. Chem. 205: 291-295) dem 0,2 % Xylose (Gewicht/Volumen) zugesetzt wurden, werden mit 5 ml Portionen JC1553 (pUC1002), NRRL B-11393, angeimpft, welche über Nacht in einem Fraser-Medium gezüchtet worden waren, welches mit Tetracyclin in einer Menge von 5 µg/ml angereichert war. Die Reaktionsbehälter werden bei 37°C unter heftigem Rühren während 6 Stunden inkubiert und anschliessend werden die Kulturen sedimentiert und mit kalter 30 millimolarer Kaliumphosphatpufferlösung (pH 7,2) gewaschen. Die Zellen werden in 1/20 des Volumens des gleichen Puffers resuspendiert, und die rohen Extrakte werden hergestellt, indem man Ultraschallzerstörung anwendet. Die Zellinhaltsstoffe werden durch Zentrifugation bei 10,000 g während 10 Minuten entfernt und die überstehenden Anteile werden bezüglich der Glucose-isomerase-Aktivität getestet. Ein Standardtest besteht darin, dass 20 µMol Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2), 2,5 µMol Kobalt(II)-chlorid, 5 µMol Magnesiumchlorid, 1 mMol D-Glucose und roher Extrakt in einem Gesamtvolumen von 1 ml angewandt werden. Die optimale Temperatur für die biologische Konversion unter diesen Bedingungen ist etwa 60°C. Der Ueberschuss an Glucosekonversion in Fructose wird bestimmt, indem man Proben von 0,02 ml zu verschiedenen Zeiten nimmt und diese Proberöhrchen zusetzt, welche 0,98 ml Wasser plus 3,5 ml konzentrierte Chlorwasserstoffsäure enthalten. 1 ml einer 0,05-prozentigen Lösung von Resorcin in Aethanol wird dem Teströhrchen zugegeben, welches sodann auf 77°C während 8 Minuten erwärmt wird. Die Teströhrchen werden sodann in Eiswasserbad gekühlt

und die optische Dichte bei 420 nm gemessen.

Obwohl das obige Verfahren das Enzym in einer zellfreien Form (Rohextrakt) anwendet, um Glucose in Fructose Überzuführen kann die Konversion ebenso angewandt werden, wenn das Enzym in einer immobilisierten Form vorliegt, indem man Verfahrensweisen anwendet die dem Fachmann gut bekannt sind.

Es bleibt der Geschicklichkeit des Fachmanns überlassen die Konzentrationen an Reagenzien, Substraten und Enzymen, wie auch die Reaktionsbedingungen in den obigen Beispielen zu verändern und er wird trotzdem zu den erwünschten Resultaten gelangen.

Beispiel 6: Andere Trägermaterialien, Wirte- und Gen-Quellen.

Beispiele für andere Trägermaterialien, welche bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung angewandt werden können, sind Plasmide wie zum Beispiel pBR322 und pBR313, welche eine Ampicillin und Tetracyclin-Resistenz codieren, pSC101, welcher eine Tetracyclin-Resistenz codiert, pCR11, welcher eine Kanamycin-Resistenz codiert, und Hefe 2 μ Plasmid DNA und Bakteriophagen-vektoren wie zum Beispiel Charon A Phage.

Beispiele für andere Wirte für das Ueberträgermaterial sind irgendwelche E. coli K-12-Derivate (Bacteriological Reviews, Dec. 1972, Seiten 525-557) (diese sind akzeptiert gemäss den NIH-Richtlinien) und Hefen, andere Pilze oder Bakteria. Es sei festgehalten, dass auch die letzt genannten Wirte ebenso gemäss den NIH-Richtlinien approbiert sein müssen. Alle diese Enzyme die hier angewandt werden

können von New England Biolabs, Beverly, Mass., USA, erhalten werden.

Beispiele für andere Gen-Quellen, welche zur Ausführung der vorliegenden Erfindung dienen können sind irgendwelche Glucose-isomerase-Gene, entweder mikrobiellen oder anderen Ursprungs.

Bei Anwendung der oben angegebenen Verfahrensweisen können irgendwelche anderen genetische Elemente, welche andere Enzyme codieren, wie beispielsweise alkalische Protease, Amylase, Cholesterin-oxidase und anderes, aufgebaut werden.

Das Plasmid pUC1002 kann vom Wirtsbakterium isoliert werden, indem man nach der Verfahrensweise vorgeht, wie dies für das Plasmid pMB9 in Beispiel 1 weiter oben erläutert ist.

Die in der vorliegenden Beschreibung erläuterten Arbeiten wurden alle gemäss den physikalischen und biologischen Isolations- und Abschluss-anforderungen ausgeführt wie sie in den NIH-Richtlinien angegeben sind.

Aufstellung der verwendeten Bezugszeichen

HindIII, EcoRI, BamHI, Sall, HpaI

- Einschränkung von Endonuclease
Spaltpositionen

Tc - Gencodierung für die Widerstandsfähigkeit
gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin

AGCT - einkettiges DNA-Fragment, welches die Basen
Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin enthält

T4 DNA Ligase

- Enzym, welches bezüglich des bakteriophagen T4
codiert ist, und welches die kovalente Verbindung
von Polydeoxynucleotiden katalysiert

Xyl - Xylose

pMB9 - nicht übertragbarer autonom replizierender E. coli
Plasmid

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines genetischen Elementes, welches die Codierung für ein Enzym trägt, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - a) ein geeignetes Kloning-Ueberträgermaterial ausschneidet, wodurch man eine erste lineare DNA-Sequenz erhält,
 - b) eine Chromosomen-DNA ausschneidet, welche das erwünschte Enzym-Gen trägt, um eine zweite lineare DNA-Sequenz zu erhalten, welche das erwünschte Enzym-Gen trägt, und man
 - c) die genannte erste lineare DNA-Sequenz mit der genannten zweiten linearen DNA-Sequenz verbindet.
2. Verfahren nach Punkt 1 zum Aufbau eines genetischen Elementes, welches die Codierung für das Enzym Glucose-isomerase trägt, gekennzeichnet dadurch, daß man in Stufe
 - b) eine Chromosomen-DNA, welche ein Glucoseisomerase-Gen trägt, ausschneidet.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß man als Kloning-Ueberträgermaterial ein Plasmid verwendet.
4. Verfahren nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß man als Plasmid ein pMB9 Plasmid verwendet.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man in Stufe b) eine Chromosomen-DNA aus E. coli K37 verwendet.
6. Verfahren nach Punkt 1 bis 5 zum Aufbau des aus dem Plasmid pUC1002 bestehenden genetischen Elements, gekennzeichnet dadurch, daß man in Stufe
 - a) das Plasmid pMB9 und in Stufe
 - b) E. coli K37 verwendet.

