



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 273 286 A1

4(61) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 316 092 4	(22)	22.06.88	(44)	08.11.89
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Laplace, Frank, Dr. rer. nat.; Müller, Jörg, Dipl.-Biol.; Malke, Horst, Prof. Dr. so. nat., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung Polylinker-tragender Streptococcus-Escherichia coli-multicopy-shuttle-Plasmide minimierter Molekülgröße				

(55) Streptococcus, Escherichia coli, shuttle-Plasmide mit Polylinker, Plasmid pLM2, Plasmid pLM3, multicopy-Plasmid, E. coli-Phasmid pMc, Streptokokkenplasmid der pLKM-Serie, Ligation, Transformation, Deletionsplasmid

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Streptococcus-Escherichia coli-multicopy-shuttle-Plasmide minimierter Molekülgröße mit Polylinker. Sie verfolgt das Ziel, neue universelle Vektorplasmide für die Belange der Gentechnik bereitzustellen. Die dieser Zielstellung zugeordnete Aufgabe wird gelöst, indem man

- zunächst ein Polylinker-tragendes Streptokokkenplasmid der pLKM-Serie in seinem Polylinker öffnet und das E. coli-Phasmid pMc, einen Polylinker-tragenden Vektor, in zwei Fragmente zerlegt,
- danach diese Fragmente in eine Ligationsansatz gibt und mit diesem einen E. coli-Rezipientenstamm transformiert sowie
- anschließend unter den Transformantenklonen Deletionsplasmide der Typen pLM2 und pLM3 selektiert, die sich durch eine geringe Molekülgröße, durch den Besitz eines Polylinkers und nach Rücktransformation in Streptococcus sanguis-Rezipienten durch den Status eines multicopy-Plasmids auszeichnen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung Polylinker-tragender **Streptococcus-Escherichia coli**-multicopy-shuttle-Plasmide minimierter Molekülgröße unter Anwendung gentechnologischer Standardverfahrensschritte, **gekennzeichnet dadurch**, daß man zunächst
 - einerseits einen Polylinker-tragenden **Streptococcus**-Klonierungsvektor der pLKM-Serie durch Behandlung mit der Restriktase PstI linearisiert,
 - andererseits das Polylinker-tragende **Escherichia coli**-Plasmid pMc durch Behandlung mit der Restriktase PstI in zwei DNS-Fragmente zerlegt,
 - die auf diese Weise gewonnenen 3 DNS-Fragmente in einen Ligationsansatz gibt und mit diesem Ansatz einen Erythromycin-sensitiven **Escherichia coli**-Rezipientenstamm transformiert,
 - unter den erhaltenen Erythromycin-resistenten **Escherichia coli**-Transformantenklonen solche selektiert, die rekombinante Polylinker-tragende Plasmide der pLM-Familie mit einer Größe von weniger als 7,7 kb tragen, und aus diesen Klonen die Plasmid-DNS isoliert,
 - mit der so bereitgestellten Plasmid-DNS anschließend einen Erythromycin-sensitiven **Streptococcus**-Rezipientenstamm transformiert sowie
 - unter den erhaltenen Erythromycin-resistenten **Streptococcus**-Transformantenklonen solche ausgewählt, deren pLM-Plasmide den Status eines multicopy-Plasmids tragen, und aus diesen Klonen die Plasmid-DNS isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man im Eingangsschritt den Polylinker-tragenden **Streptococcus**-Klonierungsvektor pLKM 6181 einsetzt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß man zur Transformation mit dem Ligationsansatz den Rezipienten **Escherichia coli** JM 101 heranzieht.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß man unter den Erythromycin-resistenten **Escherichia coli**-Transformantenklonen, vorzugsweise unter den Erythromycin-resistenten **E. coli** JM 101-Transformantenklonen, solche selektiert, die Deletionsplasmide vom Typ pLM2 (Polylinker-tragend; Molekülgröße 4,1 kb) oder vom Typ pLM3 (Polylinker-tragend; Molekülgröße 4,6 kb) besitzen.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß man zur Rücktransformation der pLM2- sowie der pLM3-Plasmid-DNS den Rezipientenstamm **Streptococcus sanguis** Challis 6 heranzieht.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1 und 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß man unter den erhaltenen Erythromycin-resistenten **Streptococcus sanguis** Challis 6-Transformanten solche auswählt, deren pLM2- bzw. pLM3-Plasmid jeweils den Status eines multicopy-Plasmids tragen.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer **Streptococcus-Escherichia coli**-multicopy-shuttle-Plasmide minimierter Molekülgröße, die einen Polylinker tragen und vorteilhaft zur Klonierung von Fremdgenen in **Streptococcus** und **Escherichia coli** herangezogen werden können.

Die Erfindung bietet Anwendungsmöglichkeiten in der Gentechnologie sowie auf anderen Gebieten der Molekularbiologie und nachgelagert damit vor allem in der pharmazeutisch-biotechnologischen Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bekannt sind eine Reihe von **Streptococcus-Escherichia coli**-shuttle-Vektoren, die auf der Basis des bekannten Streptokokken-Vektors pSM6 und verschiedener **E. coli**-Vektoren konstruiert wurden, wie z. B. pSM618 oder pSM6322 (Übersicht bei FERRETTI & CURTISS [Eds.] 1987, *Streptococcal Genetics*, American Society for Microbiology, Washington, sowie LAPLACE et al., 1988, *J. Basic Microbiology*). Diese Plasmide zeichnen sich aus

- durch eine Molekülgröße von mindestens 8,4 kb,
- durch singuläre Spaltorte für eine Reihe von Restriktasen (z. B. EcoRI, BamHI, HindIII, Sall, XbaI) sowie
- durch das Vorhandensein von mindestens zwei Resistenzmarkern (z. B. für Erythromycin-Lincomycinresistenz und Ampicillinresistenz).

Nachteilig schlagen bei ihrem Einsatz als Plasmidvektoren in gentechnischen Konstruktionen ihr relativ großes Molekulargewicht und ihre geringe Kopiezahl zu Buche.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, neue *Streptococcus-Escherichia coli*-multicopy-shuttle-Plasmide mit minimierter Molekülgröße und Polylinker für die Belange der Gentechnologie bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein gentechnisch-mikrobiologisches Verfahren zu beschreiben, mit dessen Hilfe durch aufeinanderfolgend ausgeführte Komplexe gentechnologischer Verfahrensschritte neue *Streptococcus-E. coli*-multicopy-shuttle-Plasmide minimierter Molekülgröße mit Polylinker gewonnen werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in ihrem Grundzug wie folgt gelöst:

Unter Anwendung gentechnologischer Standardverfahrensschritte wird zunächst

- einerseits ein *Streptococcus*-Klonierungsvektor der pLKM-Serie, der neben der Erythromycin-Resistenz als Phänotyp-Marker einen Polylinker mit 10 singulären Restriktionsorten in sich trägt, durch Behandlung mit der Restriktase PstI linearisiert sowie
- andererseits das literaturbekannte *Escherichia coli*-Plasmid pMc (Molekülgröße 3,8 kb; Chloramphenicol-Resistenz // siehe auch P. STANSSENS et al., Gene 36, 1985, 211-223), das einen Polylinker mit 7 singulären Restriktionsorten, nämlich für die Restriktasen EcoRI, SmaI, BamHI, SalI, HindIII und XbaI, in sich trägt, gleichfalls durch Behandlung mit der Restriktase PstI in 2 Fragmente (der Teilgrößen 2,0 kb und 1,8 kb) zerlegt.

Ausgewählte Polylinker-tragende *Streptococcus*-pLKM-Klonierungsvektoren sind inzwischen in Anwendung des Verfahrens einer kürzlichen Erfindung des Zentralinstituts verfügbar geworden.

Die auf diese Weise erhaltenen 3 PstI-PstI-DNS-Fragmente werden in einen Ligationsansatz gegeben, und mit diesem Ansatz wird eine Population eines Erythromycin-sensitiven *Escherichia coli*-Rezipientenstammes transformiert. Unter den Erythromycin-resistenten *Escherichia coli*-Klonen, die im Ergebnis dieser Transformationsprozedur gewonnen wurden, werden dann anschließend solche selektiert, welche rekombinante Polylinker-tragende Plasmide der pLM-Familie mit einer Größe von weniger als 7,7 kb tragen.

Nachdem aus diesen Klonen die Plasmid-DNS isoliert worden ist, wird mit der so bereitgestellten Plasmid-DNS abschließend ein Erythromycin-sensitiver *Streptococcus*-Rezipientenstamm transformiert. Unter den im Ergebnis dieser Prozedur erhaltenen Erythromycin-resistenten *Streptococcus*-Transformantenklonen werden letztlich noch solche ausgewählt, deren pLM-Plasmide den Status eines multicopy-Plasmids aufweisen, und aus den Klonen dieser Charakterisierung wird in an sich bekannter Weise die Plasmid-DNS isoliert.

Der Grundzug des Verfahrens wird nun zunächst dahingehend weiter ausgestaltet, daß im Eingangsschritt des Verfahrens der *Streptococcus*-Klonierungsvektor pLKM 6181 (Molekülgröße 5,9 kb; Erythromycin-Resistenz) herangezogen wird. Dieser Vektor trägt einen Polylinker, der singuläre Spaltorte unter anderem für die Restriktasen HaeIII, SphI, PstI, SalI, XbaI, BamHI, XmaI, SmaI und SstI aufweist.

Ein mit dem Vektor pLKM transformierter *Streptococcus sanguis* Challis-Stamm ist in der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften, Beutenbergstr. 11, Jena, DDR - 6900 unter der Registriernummer IMET deponiert worden. Am Beginn werden benötigte Mengen

a) an pLKM 6181-Plasmid-DNS aus einer Kultur von *S. sanguis* Challis 57 (pLKM 6181) bzw.

b) an pMc-Plasmid-DNS aus einer Kultur von *E. coli* JM 101 (pMc)

in an sich bekannter Weise isoliert, gereinigt und im TrisHCl-Puffer gelöst.

Zur Transformation mit dem verfahrensgemäß bereiteten Ligationsansatz, der neben den PstI-PstI-DNS-Fragmenten obiger Beschaffenheit von 1,8 kb und 2,0 kb Größe als ein drittes PstI-PstI-DNS-Fragment von 5,9 kb Größe enthält, wird nunmehr der *E. coli*-Rezipient JM 101 eingesetzt.

Im Anschluß an die Transformationsreaktion wird unter den erhaltenen Erythromycin-resistenten *E. coli* JM 101-Transformantenklonen ein Screening nach Plasmiden minimierter Molekülgröße, insbesondere nach solchen mit einer Molekülgröße von weniger als 7,7 kb durchgeführt. Unter diesen Mini-Plasmiden wird dann ein erneutes Screening nach Polylinker-tragenden Deletionsplasmiden vom Typ pLM 2 (Molekülgröße 4,1 kb) sowie vom Typ pLM 3 (Molekülgröße 4,6 kb) vorgenommen. Beide Neuplasme, sowohl pLM 2 als auch pLM 3, weisen einen Polylinker auf, der insbesondere singuläre Spaltorte wenigstens für die Restriktasen SmaI, BamHI, XbaI, SalI und PstI besitzt.

Klone von *E. coli* JM 101, welche die gewünschten minimierten Plasmide vom Typ pLM 2 sowie pLM 3 tragen, werden kultiviert, und aus diesen Kulturen wird in an sich bekannter Weise die jeweilige Plasmid-DNS isoliert, gereinigt und in TrisHCl-Puffer gelöst. Mit Proben dieser Plasmid-DNS wird für den abschließenden Schritt des Verfahrens der Rezipientenstamm *S. sanguis* Challis 6 (rück-) transformiert und eine Selektion auf Erythromycin-resistente Challis-Transformantenklone durchgeführt. Aus Kulturen dieser Transformantenstämme wird gleichfalls die Plasmid-DNS isoliert und durch Behandlung mit einer Kollektion von Restriktasen, so insbesondere mit EcoRI, HindIII, HincII, AvalI, PvuII, SmaI, SalI, XbaI, BamHI, PstI, HaeIII, HpaI und AvalI erneut

a) die Molekülgröße bestimmt sowie

b) jeweils die Anwesenheit eines Polylinkers nachgewiesen;

weiterhin werden unter den durch diese Rücktransformation gewonnenen pLM-shuttle-Plasmiden solche ausgewählt, die über einen multicopy-Status verfügen.

Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurden für die *Streptococcus-Escherichia coli*-multicopy-shuttle-Plasmide pLM 2 und pLM 3 jeweils folgende Parameter bestätigt (s. a. Abbildung):

- Plasmid pLM 2: - Molekülgröße 4,1 kb;
 - Vorliegen eines Polylinkers mit singulären Spaltorten für die oben angeführten Restriktasen sowie EcoRI;
 - Vorhandensein eines Markers für die Erythromycin-Resistenz;
 - vierfach erhöhte Kopiezahl (26 Kopien pro Zelle) im Vergleich zum Ausgangsplasmid pLKM 6181;

- Plasmid pLM3: — Molekülgröße 4,8 kb;
 — Vorliegen eines Polylinkers mit singulären Spaltorten für die o. a. Restriktasen;
 — Vorhandensein eines Markers für die Erythromycin-Resistenz;
 — vierfach erhöhte Kopiezahl im Vergleich zum Ausgangsplasmid pLKM 6181.

Wie in der Abbildung erkenntlich, fehlt dem shuttle-Plasmid pLM2 im Vergleich zum Plasmid pLM3 ein DNS-Abschnitt, der durch eine charakteristische Anordnung von je einem EcoRI- und HincII-Spaltort gekennzeichnet ist. Mit pLM2 und pLM3, den neuen, Polylinker-tragenden *Streptococcus-Escherichia coli*-multicopy-shuttle-Klonierungsvektoren minimierter Molekülgröße, stehen originäre, strukturoptimierte Trägerreplica für anschließende gentechnologische Projekte zur Verfügung. Besonders vorteilhaft lassen sich diese beiden neuen shuttle-Plasmide zur Expression von Genen in grampositiven Wirten einsetzen, was durch ihre geringe Molekülgröße, durch die Anhäufung von singulären Spaltorten, darunter so gebräuchlicher wie PstI, SalI und SmaI, sowie durch die erhöhte Kopiezahl ermöglicht wird.

Ausführungsbeispiel

1 a) Gewinnung von Plasmid-DNS pLKM6181 und Plasmid-DNS pMc.

DNS des Plasmids pLKM6181 wird aus Zellen des Stammes *S. sanguis* Challis 6 (pLKM6181) in der folgenden Weise gewonnen.

500 ml einer Übernachtskultur dieses Stammes, die in BHI-Medium mit 2 M Glukose, 0,5 M D-L-Threonin, 2,5 % Pferdeserum und 5 µg/ml Erythromycin gezüchtet wurde, werden 15 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden mit 50 mM TrisHCl (pH 8,2) gewaschen und anschließend in 50 ml desselben Puffers resuspendiert. Nach Zugabe einer Lysozymlösung (100 mg Lysozym in 5 ml 50 mM TrisHCl, pH 8,2) wird 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und in 16 ml 50 mM TrisHCl resuspendiert. Anschließend werden 20 mg Pronase in 2 ml TrisHCl zugegeben, und es wird 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Zellyse erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer 10%igen SDS-Lösung. Danach wird der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH auf 12,1 eingestellt, wodurch die Denaturierung der chromosomalen DNS erreicht wird. Anschließend erfolgt durch schnelle Zugabe einer 2 M TrisHCl-Lösung ein pH-shift auf pH 8,5. Nach Zugabe von 0,8 g kristallinem NaCl folgen schließlich zur Deproteinisierung je eine Extraktion mit einem Volumen NaCl-gesättigtem Phenol und Chloroform-isoamylalkohol-Gemisch (24:1). Anschließend wird die DNS-Lösung mit 0,1 Volumenteilen einer 3 M Na-acetat-Lösung und 2 Volumenteilen 96%igem Alkohol bei -20°C gefällt, sedimentiert und getrocknet. Die DNS wird zuletzt in 5 ml TES-Puffer aufgenommen.

Zur Abtrennung und Reinigung der Plasmid-DNS von kontaminierender chromosomaler DNS wird in an sich bekannter Weise eine Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation ausgeführt. Schließlich liegt die gereinigte zirkuläre Plasmid-DNS in einer Lösung in 10 mM TrisHCl (pH 7,5) vor und wird bei +4°C aufbewahrt.

Weiterhin wird die DNS des Plasmids pMc aus Zellen des Stammes *E. coli* JM 101 (pMc) in folgender Weise gewonnen:

500 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* JM 101 (pMc) in folgender Weise gewonnen: 500 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* JM 101 (pMc), die in LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C gezüchtet wurde, werden 15 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden mit 50 mM TrisHCl gewaschen und anschließend in 13 ml eines 50 mM TrisHCl-Puffers mit 25 % Saccharose resuspendiert. Danach werden 20 mg Lysozym zugegeben, und es erfolgt eine 5minütige Inkubation des Ansatzes. Nach der Zugabe von 3 ml einer 0,25 M EDTA-Lösung werden die Zellen 5 Minuten auf Eis gekühlt. Die Lyse erfolgt durch die Zugabe von 21 ml eines Lysemediums (50 mM TrisHCl, 62 mM EDTA, 1 % SDS, pH 8,0). Danach werden 11 ml einer 5 M NaCl-Lösung zugegeben, und der Ansatz wird vorsichtig gemischt und anschließend 20 Minuten auf Eis gekühlt.

Nach 20minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min ist im Überstand die DNS enthalten, die durch Zugabe von 0,6 Volumenteilen Isopropanol bei -20°C über Nacht ausgefällt wird. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wird das Sediment gewonnen, getrocknet und in 4,5 ml TES-Puffer resuspendiert.

Noch in der Lösung verbliebene Proteine werden durch 15minütiges Zentrifugieren bei 12000 U/min abgetrennt. Zur Abtrennung und Reinigung der Plasmid-DNS von kontaminierender chromosomaler DNS wird in an sich bekannter Weise eine Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation ausgeführt.

Schließlich liegt die gereinigte zirkuläre Plasmid-DNS in einer Lösung von 10 mM TrisHCl (pH 7,5) vor und wird bei +4°C aufbewahrt.

1 b) Konstruktion der neuen multicopy-shuttle-Plasmide pLM3 und pLM2.

Die Konstruktion der neuen shuttle-Plasmide pLM3 und pLM2 wird nunmehr folgendermaßen durchgeführt:

2 µg der auf oben beschriebene Weise isolierten Plasmid-DNS von pLKM6181 werden mit 10 Einheiten des Enzyms PstI linearisiert. Nachdem die Vollständigkeit der Spaltung gelelektrophoretisch nachgewiesen wurde, wird das Enzym PstI durch Hitzebehandlung inaktiviert (70°C, 10 Minuten). Anschließend wird die linearisierte Plasmid-DNS durch Zugabe von 1/10 Volumenteilen 3 M Na-acetat und 3 Volumenteilen 96%igem Alkohol gefällt (-70°C, 30 Minuten), in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert (12000 U/min, 10 Minuten), 2mal mit 70%igem Alkohol gewaschen, getrocknet und in 10 µl Aqua dest. gelöst.

Parallel dazu werden 5 µg der auf oben beschriebene Weise isolierten Plasmid-DNS von pMc mit 20 Einheiten des Enzyms PstI gespalten. Nachdem die Vollständigkeit der Spaltung wiederum durch den gelelektrophoretischen Nachweis der dabei entstehenden 2 Fragmente (2,0 kb + 1,8 kb) festgestellt wurde, wird das Enzym PstI durch Hitzebehandlung inaktiviert (70°C, 10 Minuten). Anschließend wird die Plasmid-DNS in der bereits für pLKM6181 beschriebenen Weise gefällt, gewaschen, getrocknet und in 10 µl Aqua dest. resuspendiert. Danach werden die Lösungen vereinigt, mit 1,5 µl Ligationspuffer (10fach konzentriert) und 4 Einheiten T4-DNS-Ligase (in 2,5 µl Ligasepuffer) versetzt und über Nacht bei einer Temperatur von 12°C belassen. Mit diesem Ligationsgemisch wird der plasmidfreie Rezipientenstamm *E. coli* JM 101 transformiert. Die

Herstellung kompetenter *E. coli* JM 101-Zellen und die Transformation selbst werden in an sich bekannter Weise ausgeführt. Auf LB-Agarplatten, die mit 100 µg/ml Erythromycin versetzt waren, wurden etwa 100 Transformantenklone selektiert. Diese Transformantenklone wurden in an sich bekannter Weise einem Plasmid-Screening unterworfen. Von diesen Plasmid-Schnellisolaten wurden je 5 µl gelelektrophoretisch analysiert, und unter ihnen wurden diejenigen ausgewählt, welche sich durch die geringste Molekülgröße auszeichnen. Je 10 µl dieser Schnellisolate mit geringer Molekülgröße wurden mit den Enzymen EcoRI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI sowie PstI behandelt und in an sich bekannter Weise gelelektrophoretisch analysiert.

Im Ergebnis wurde

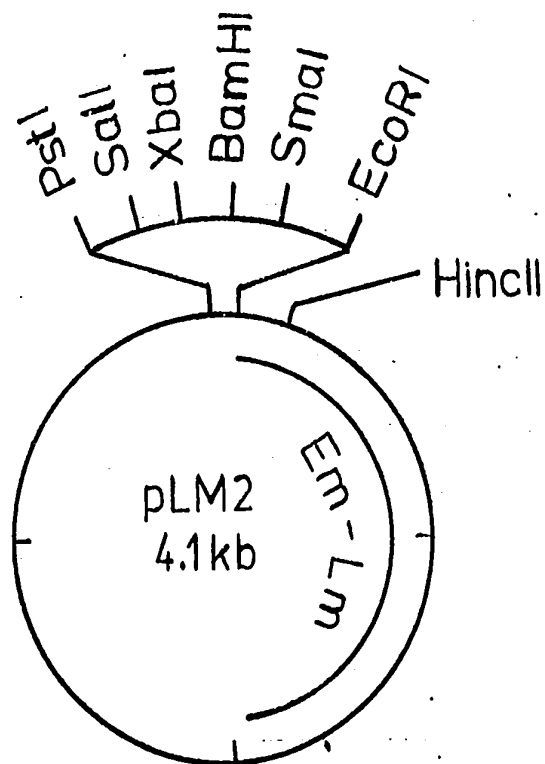
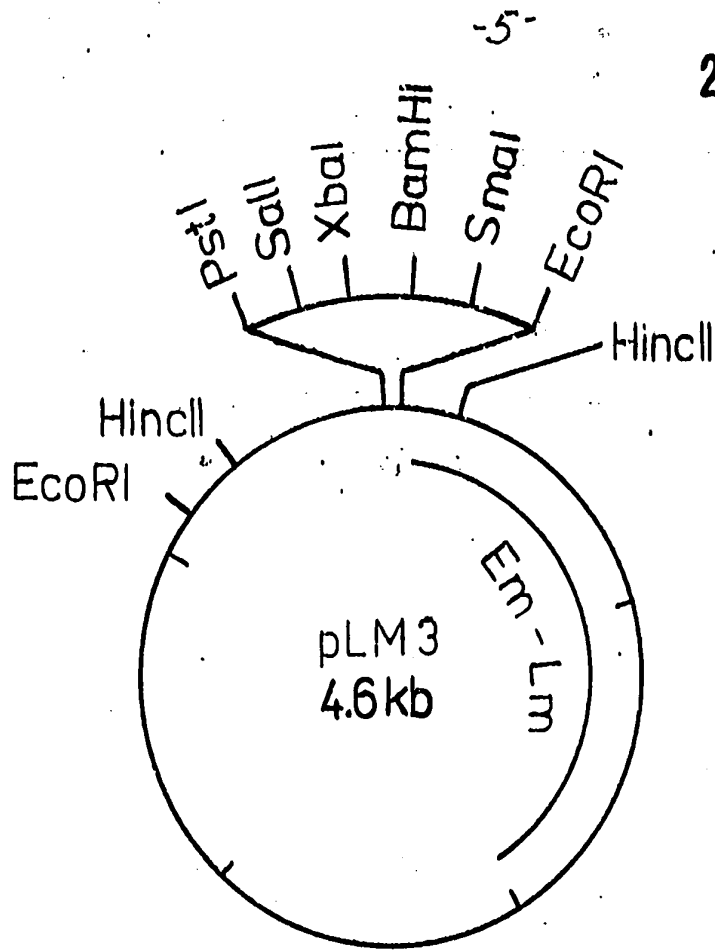
- a) ein Transformantenklon, der das 4,6 kb große Plasmid pLM3 trägt, welches einen Polylinker mit den Spaltorten SmaI, BamHI, XbaI, SalI sowie PstI und die Determinante für die Erythromycin-Resistenz besitzt sowie
- b) ein weiterer Transformantenklon, der das 4,1 kb große Plasmid pLM2 trägt, welches einen Polylinker mit den Spaltorten EcoRI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI sowie PstI und die Determinante für die Erythromycin-Resistenz aufweist, identifiziert.

Der Nachweis der Replikationsfähigkeit beider Plasmide in *Streptococcus* wurde erbracht, indem der plasmidfreie Rezipientenstamm *S. sanguis* Challis 6 mit je 30 µl eines pLM3- bzw. pLM2-Schnellisolats in an sich bekannter Weise transformiert und anschließend Erythromycin-resistente Klone isoliert wurden.

Einige dieser *S. sanguis*-Transformantenklone wurden in an sich bekannter Weise einem Plasmid-Screening unterworfen. Die erhaltenen Plasmid-Schnellisolate wurden mit den Enzymen EcoRI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI, PstI behandelt und anschließend auf an sich bekannte Weise gelelektrophoretisch analysiert. Dabei konnte die Identität dieser Plasmid-Schnellisolate mit den Plasmiden pLM3 bzw. pLM2 nachgewiesen werden.

In an sich bekannter Weise wurde die Kopiezahl der Plasmide pLM3 und pLM2 in *Streptococcus* bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß beide Plasmide eine gegenüber dem Ausgangsplasmid pLKM 6181 vierfach höhere Kopiezahl bei Replikation in Stämmen der Gattung *Streptococcus* aufweisen.

273286



22.688-0524319