

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) Lajstromszám:

202273B

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 9/22

C 12 N 1/20

(22) Bejelentés napja: 1987.11.26. (21) 5321/87

(40) Közzététel napja: 1990.02.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1991.02.28.

(72) Feltalálók:

VENETIANER Pál, 65%,
KOMÓCSIN Mihályné, 20%,
OROSZ András, Szeged, 15%,
(HU)

(73) Szabadalmaz:

MTA Szegedi Biológiai Központja,
Szeged, (HU)

(54) ELJÁRÁS BfII JELŰ ÚJ RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZ ELŐÁLLÍTÁSÁRA BACILLUS CEREUSBÓL

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás BfII jelű új restrikciós endonukleáz előállítására.

Az eljárás során *Bacillus cereus* subsp. *fluorescens* NCAIM B (P) 001018 törzset vagy annak a fenti enzimet termelő mutánsát vagy variánsát asszimilálható szén-, nitrogénforrást és ásványi sókat tartalmazó táptalajon sülyesztett, aerob körülmények között tenyésztünk, majd a sejtöregből kinyerjük a BfII enzimet.

A leírás terjedelme: 4 oldal, 2 rajz, 3 ábra

HU 202273 B

A restrikciós endonukleázok azon enzimek, melyek a kettős-láncú DNS-ben bizonyos, rájuk jellemző szekvenciákat felismernek, majd endonukleolitikusan mindkét láncot hasítják.

Mai tudásunk szerint restrikciós endonukleázok csak prokariota szervezetekben, azaz baktériumokban és kéalgákban keletkeznek, itt viszont elég gyakoriak. Az eddig ismert restrikciós endonukleázok száma meghaladja a 400-at. Különböző eredetű és szerkezetű enzimek végezhetnek azonos funkciót, ezek az ún. izoszkeizomerek. A felismerési specificitás az enzimek nagy száma mellett is kevesebb mint 100-féle.

Az enzimes bontások egyik csoportjánál a hasítás a két láncot szemben, azonos helyen vágja el, „tompá” véget eredményezve. Egy másik típusú hasítás a két láncot aszimmetrikusan vágja el, így 3'- vagy 5'- túlnyúló, „ragadós” vég keletkezik. A restrikciós endonukleázok felismerő szekvenciája gyakran ún. palindrom, azaz olyan DNS szakasz, amely leolvasás-szimmetrikus, az egyik szál bázissorrendje a komplementer szál megfelelő darabján visszafelé olvasva azonos, 25

CTGCAG

pl.: GACGTC

A felismerőhely vagy hasítóhely változataink bővítése igen nagy jelentőségű. A restrikciós endonukleázok kutatási és gyakorlati alkalmazása ma már szélesben elterjedt és sokcélú. Valamennyi feladatban fontos, némely feladatban döntő ismér, hogy ezen enzimek meghatározott helyen egy konkrét DNS szerkezetet definiálnak. A definiálható helyek és szerkezetek számának bővítése értelem-szerűen bővíti az alkalmazás és választás lehetőségeit.

A széleskörű alkalmazásból kiemelve néhányat:

- DNS fizikai térképezése
- DNS módosítása rekombinációs DNS technikával (mutánsok előállítása, nemesis)
- DNS izolálása hibridizációs próbák segítségével
- diagnózis DNS azonosítása alapján
- diagnózis DNS mutáció igazolása alapján
- faj, fajta, törzs azonosság, vagy eltérés igazolása DNS szerkezet alapján
- magasabbrendű szervezetben DNS metiláltság helyének megállapítása a hasíthatóság alapján stb.

A restrikciós endonukleázok egy érdekes alcsoportja a II S enzimtípus. Ezek nem palindrom felismerő szekvenciához kapcsolódva a felismerőhelyen kívül hasítanak, természetesen szintén specifikusan (Gene 47, 1-154, 1986).

Kutatásaink során sikerült egy olyan baktériumtörzset izolálnunk, melynek tenyészetéből egy eddig nem ismert specificitású II S típusú enzim nyerhető. A törzs *Bacillus cereus* subsp. *fluorescens*, melyet az Ipari és

Mezőgazdasági Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM B (P) 001018 számon deponáltunk.

A találmány szerint előállított BfII enzim vizsgálataknak vetettük alá, a felismerőhely és hasítóhely megállapítására. Úgy találtuk, hogy az enzim felismerőhelye:

ACGGC (N)₁₂

TGCCG (N)₁₃

(a felismerőhelytől 12 ill. 13 nukleotidnál történik a hasítás)

A találmány szerint a BfII enzim előállítására úgy járunk el, hogy *Bacillus cereus* subsp. *fluorescens* NCAIM B (P) 001018 törzset asszimilálható szén-, nitrogénforrást és ásványi sókat tartalmazó táptalajon szütyesztett, levegőztetett körülmények között tenyészítünk, majd a sejttömegből a keletkezett enzimet kinyerjük.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példák kapcsán részletesen is ismertetjük.

1. példa

Bacillus cereus subsp. *fluorescens* NCAIM (P) 001018 számú törzset YTA jelű agaron tartjuk fenn, 2-3 havonkénti átoltással, a 37 °C-on 16 óra alatt kinőtt ferde agar tenyészeteket jégszekrényben +4 °C-on tárolva.

Az enzim előállításához ugyanezen táptalajból Petri-csészében lemezt öntünk, a törzset erre szélesztjük. A kinőtt telepek közül néhányat kaccsal levéve 10 ml YTB táptalajban szuszpendáljuk, és egy éjszakán át szaporítjuk. Az „overnight” szuszpenzióból 1 ml-rel rázó lombikban 100 ml YTB táptalajt oltunk, ezt 6 órán át rázóasztalon (180 rpm) 37 °C-on inkubáljuk, és oltótenyészetként használjuk. A termelő fermentációhoz 1 l YTB táptalajt sterilizálunk 3 l-es Erlenmeyer lombikban, ezt 10 ml oltótenysézzel oltjuk be. A szaporítás rázóasztalon (180 rpm) 37 °C-on történik, 8 órán át. A fermentációt leállítva a fermentlevet centrifugáljuk (4000 rpm, 30 perc), 1 l fermentléből 50 g fuganedves sejtet nyerünk. A sejteket kétszeres mennyiségű 0,01 M 2-merkaptó-etanol-tartalmú, 0,01 M pH = 7,5-Tris-HCl pufferban szuszpendáljuk, a sejtek feltárását ultrahanggal, SONIFER CELL DISRUPTOR készülékkel 10 percig végezzük. A sejttörmelék 60 perces ultracentrifugálással (35 000 rpm) távolítjuk el. A felülúszóhoz 1 M koncentrációig NaCl-ot adunk, és a sejtkivonatot 4 x 90 cm-es Bio-Gel A-0,5 m oszlopon kromatografáljuk. Az eluens 1 M NaCl, 0,01 M pH = 7,5 Tris-HCl, 0,01 M 2-merkaptó-etanol-oldat. 6 ml-es frakciókat szedünk, ezekben restrikciós enzim-aktivitást vizsgálunk. Módja az alábbi: 0,01 M pH = 7,8 Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 6 mM 2-merkaptó-etanol, 0,1 mg/ml zselatin közeghez 25 µl végtér fogatban 1 µg lambda fág DNS-t és 2 µl mintát adunk. Az inkubálást

37 °C-on 60 percig végezzük. A reakciót 3 µl reagenssel állítjuk le, ennek összetétele: 0,2 M EDTA, 50% szaccharóz, 0,1% bróm-fenolkék. Az elegyet 1,4%-os agaróz gélen elektroforetízáljuk.

Az elektroforézis puffere 0,05 M Tris-acetát pH = 8,05, 0,02 M nátrium-acetát, 2 mM EDTA. 200 V, 2 óra. A DNS-t etidium-bromiddal festve detektáljuk [lásd: Biochemistry 12, 3055 (1973)]. Az enzimaktivitást mutató frakciókat egyesítjük és PC pufferral szemben dializáljuk. A következő tisztításnál PC pufferral ekvibrált 3 x 25 cm-es Whatman DE52 DEAE-cellulóz oszlopot alkalmazunk, az elválasztás lineáris gradiens elúcióval történik, 1000 ml PC pufferban 0-0,5 M NaCl-ot adagolva. A 0,15-0,20 M NaCl-tartalom mellett eluált frakciókat gyűjtjük, ezeket egyesítve, a fenti módon PC pufferral szemben dializáljuk.

Végül 1,5 x 15 cm-es Whatman P 11 foszfo-cellulóz oszlopon 200 ml PC pufferral választjuk el a 0,50-0,7 M NaCl-tartalom mellett eluálódó enzimaktiv fehérjéket, ezt tároló pufferral szemben dializáljuk.

A nyert enzim hozama 50 egység/g nedves sejt. Jele: BfII. Az enzim nem igényel Na- vagy K-ionokat, Mg²⁺ igénye kb. 3 mM, pH optimuma 7,8, hőoptimuma 37 °C.

A példákban alkalmazott táptalajok és pufferok összetétele:

YTA táptalaj:

Bacto tripton	10 g,
Bacto élesztőkivonat	5 g,
NaCl	5 g,
Bacto agar	15 g,
csapvíz	ad 1 l.

Sterilizés: 120 °C-on, 30 percig.

YTB táptalaj:

Bacto tripton	10 g,
Bacto élesztőkivonat	5 g,
NaCl	5 g,
csapvíz	ad 1 l.

Sterilizés: 120 °C-on 30 percig.

PC puffer:

0,01 M pH = 7,4 kálium-foszfát puffer,
0,1 mM EDTA,
0,01 M 2-merkaptó-etanol.

Tároló puffer:

0,05 M KCl
0,01 M pH = 7,5 Tris-HCl puffer
0,1 mM EDTA
1,0 mM ditio-treitol
200 µg/ml marhaszérum albumin
50% glicerin.

2. példa

A BfII enzim jellemzése

5 a) Felismerőhely igazolása

Ismert módon elvégezzük pBR 322 plazmid kettős hasítását az új enzimmel, és vele, illetve mellette az alábbi ismert enzimekkel: 10 BspI, HpaII, AluI, MboII, AvaII, SalI, HindIII, BamHI, BclI, PstI, BglI, FokI. Az enzimek Biolabs illetve REANAL termékek. A nyert fragmentumok analízise azt mutatja, hogy az új enzim a pBR322 plazmidot három helyen hasítja a 600-620, 1150-1170 és 2950-2980 bázispárok között. A fenti három szakaszon két homológ régió található: a CCTAA és az ACGGC szerkezet. Lambda bakteriofággal végzett hasonló vizsgálat a CCTAA felismerőhelyet kizárja, és az ACGGC szerkezetet igazolja; minthogy ennek előfordulási gyakorisága arányos a kimutatható bontási fragmensek számával. Ez a felismerőhely II S típusú enzimet jelent, egyben utal arra, hogy a hasítóhely a felismerő szekvencián kívül van. 25

b) A hasítóhely megállapítása

Ebben a vizsgálatban pKLT1 plazmidot, 30 vagy más, kis molekulatömegű DNS-t használtunk, melyből kihasítható volt a pKLT1 plazmid HindIII-HinfI szakasza. A kívánt DNS fragmens bázisszereje az 1. ábra szerinti. A fragmenst 5'-végen jelöljük polinukleotid-kinnázzal gamma-³²P-ATP jelenlétében. [Az ismert módszer leírása: Maniatis Lab. Manual, Cold Spring Harbor Lab., N. Y. (1982)]. A preparátumokat a vizsgált enzimmel emésztjük az alábbi közegben: 1,01 M pH = 40 = 7,8 Tris-HCl puffer, 0,003 M MgCl₂, 100 µg/ml zselatin, 1 µl, az 1. példa szerinti enzimoldatból, 1 µg DNS fragmens; 50 µl össztérfogat, 37 °C-on, 1 órán át inkubálva. Az emésztés során kb. 30 bázispár hosszú 45 HindIII-BfII fragmens keletkezik. Ezt Maxam-Gilbert módszerrel vizsgáljuk. [Methods Enzymol., 5, 499-560 (1980)]. A gélanalízis eredménye szerint a hasítóhely ACGGC(N)₁₂ illetve TGCCG(N)₁₃ (lásd 2. ábra). 50

3. példa

Az 1. példa szerint előállított fermentléből a sejtömeget kinyerjük. 26 g nedves sejtanyaghoz 40 ml feltárápuffert (0,01 M 2-merkaptó-etanolt tartalmazó 0,01 M pH = 7,5 tris-HCl-t) adunk. Ultrahangos kezelést végzünk (50%-os munkaidő, 10 perc időtartam), a 60 törmelékcentrifugálással eltávolítjuk (35 000 rpm, 60 perc).

A felülúszóhoz (48 ml) 1,25 g KCl-ot és 3,36 ml 10%-os Polymin P-t (Serva, Heidelberg) adunk, az elegyet olvadó jég hőfokon 65 30 percig lassan keverjük, a keletkező csa-

padékot centrifugálással elválasztjuk (20 000 rpm, 20 perc). A nyers, fehérjetartalmú oldatot 6 órán át dializáljuk. Az első tisztítólépésként Heparin-Sepharose kromatográfiát végzünk, 1,5 x 15 cm-es oszlopon, 30 ml/h fejlesztő sebességgel, eluensként 0,0-0,6 M NaCl-t tartalmazó PC puffert alkalmazva. Az aktív frakció 0,06-0,15 M NaCl-nál nyerhető. A továbbtisztítást 1,5 x 5,0 cm-es aminopentil kromatográfiás oszlopon végzük, eluensként 0,0-0,6 M NaCl-os PC puffert alkalmazva. A gyűjtött frakciók 0,12-0,18 M NaCl értéknél vannak.

Az oldatot tárolópufferral szemben dializáljuk. A nyert preparátum aktivitása megfelel az 1. példa szerintinek.

4. példa

Bacillus cereus subsp. *fluorescens* NCAIM B (P) 001018 számú törzset YTA agaron tenyésztjük. Háromnapos ferde agar tenyészetet lemosunk 5 ml AGK táptalajjal, majd a szuszpenzióval 300 ml AGK táptalajt oltunk 1 l-es Erlenmeyer lombikban. A tenyésztést 20 órán át 37 °C-on folytatjuk rázatással (rpm 350). A tenyészetet centrifugáljuk (8000 rpm, 30 perc), 24 g fuganedves sejtömeget nyerünk, ezt az 1. példa szerint dolgozzuk fel. A kapott enzim hasítási jellege szerint a BfII-el azonos. Ismert DNS molekulák emésztésének az eredményét mutatja be a 3. ábra.

Az AGK táptalaj összetétele:

aszparagin	1 g	
glükóz	5 g	
kukoricalékvár por	2 g	
kálium-dihidrogén-foszfát	0,05 g	40
magnézium-szulfát	0,01 g	
csapvíz	ad 1 l.	

SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás BfII jelű restrikciós endonukleáz előállítására, azzal jellemezve, hogy *Bacillus cereus* subsp. *fluorescens* NCAIM B (P) 001018 törzset vagy annak a fenti enzimet termelő mutánsát vagy variánsát asszimilálható szén-, nitrogénforrást és ásványi sót tartalmazó táptalajon sülyesztett, aerob körülmények között tenyésztünk, majd a sejtömegeből kinyerjük a BfII enzimet.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
R 4981 - KJK

91.3911.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató

pKLT1 fragmentum szekvencia

513 523 533 543 553 563 573
AAGCTTGCTT CTTTGCTGAC GAGTGGCGGA CGGGTGAGTA ATGTCTGGGA AACTGCCTGA TGGAGGGGGA

583 593 603 613 623 633 643
TAACTACTGG AAACGGTAGC TAATACCGCA TAACGTGCGA AGACCAAAGA GGGGGACCTT CGGGCCTCTT

653 663 673 683 693 703 713
GCCATCGGAT CGCGGTGGTC CCACCTGACC CCATGCCGAA CTCAGAAGTG AAACGCCGTA GCGCCGATGG

723 733 743 753 763 773 783
CGGCAGTAG CGCGGTGGTC CCACCTGACC CCATGCCGAA CTCAGAAGTG AAACGCCGTA GCGCCGATGG

793 803 813 823 833 843 853
AGTGTGGGG TCTCCCATG CGAGAGTAGG GAACTGCCAC CCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA

863 873 883 893 903 913 923
GACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGGGA

933 943 953 963 973 983 993
CGGATTTGA ACGTTGCGAA GCAACGGCCC GGAGGGTGGC GGGCAGGACG CCCGCCATAA ACTGCCAGGC

1003 1013 1023 1033 1043 1053 1063
TCAAATTAA GCAGAAGGCC ATCCTGAGGA TGGCCTTTTT GCGTTTCTAC AAATCCCGG TACCGGCCGG

1073
ACCGGCCAA G

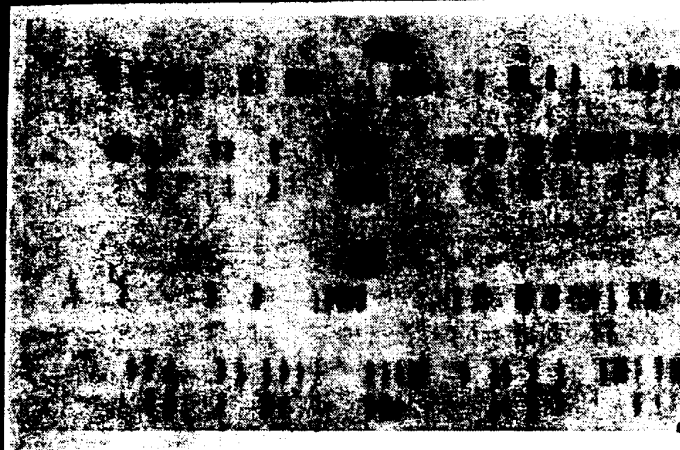
1. ábra
pKLT1 plazmid HindIII - HinfI szakasza

Hand III - ISI (2)

C+T
C
G+A
G

Hand III - ISI (2)

C+T
C
G+A
G



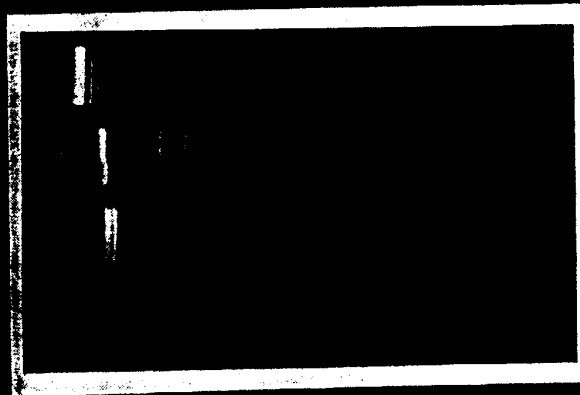
2. abra

1-84g DUS
+ ISI

84322 DUS
+ ISI

PKLT4 DUS
+ ISI

2-84g DUS
+ ISI



3. abra