

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT



(11) 157562 B

(21) Patentansøgning nr.: 3187/79

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 9/22

(22) Indleveringsdag: 27 jul 1979

(41) Alm. tilgængelig: 29 jan 1980

(44) Fremlagt: 22 jan 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 jul 1978 JP 92094/78

(71) Ansøger: *RIKAGAKU KENKYUSHO; No. 2-1; Hirosawa; Wako-shi; Saitama-ken, JP

(72) Opfinder: Tadahiko *Ando; JP, Takehiko *Shibata; JP, Eiji *Hayase; JP, Shukuko *Ikawa; JP

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af mindst to deoxyribonukleaser

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3187-79

Deoxyribonucleaser (DNaser) fremstilles ved dyrkning af en transforme-
ret stamme, der tilhører slægten Bacillus, (især Bacillus subtilis,
f.eks. B.s. med ATCC nr. 31522-31527), opsamling af et cellefrit ekstrakt
fra celler, der er opnået ved dyrkningen navnlig i en periode, der
ligger mellem den sene logaritmiske vækstfase og den begyndende statio-
nære vækstfase, og fraktionering og/eller separation af de cellefrie
ekstrakter til opnåelse af 2 eller flere DNaser, der hver har for-
skellig substratspecificitet.

DK 157562 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af mindst to deoxyribonukleaser udvalgt blandt Bsu R, Bsu 1247 I, Bsu 1231 I og Bsu 1231 II.

5 Enzymer, der spalter deoxyribonukleinsyre (DNA), betegnes deoxyribonukleaser eller DNaser og forekommer i forskellige levende organismer, hvor de deltager i vigtige livsprocesser, såsom metabolisme, nedbrydning, syntese og rekombination. Disse enzymeres egenskaber og deres biologiske funktioner, har, specielt inden for proteinkemio-
10 området og de biologiske videnskaber, i den seneste tid tiltrukket sig opmærksomhed.

I studiet af strukturen og funktionen af generne er det vigtigt at kunne frembringe og udskille enzymer, der har specifikke virkemåder,
15 og deoxyribonukleinsyrenedbrydende enzymer er værdifulde som biokemiske reagenser til molekylær kloning af gener og artsforbedringer.

DNaser klassificeres groft i 2 typer, nemlig exonukleaser og endonukleaser ifølge deres virkemåde. Mere specifikt virker det førstnævnte enzym på et polynukleotid fra dets terminale ende og frigør
20 efterhånden nukleotid eller oligonukleotid. Det sidstnævnte enzym spalter phosphodiesterbindinger i DNA-molekylet.

25 Inden for enzymområdet af endonukleasetypen er der i den senere tid gjort store fremskridt i studierne af enzymer, der udviser specificitet over for DNA-strukturer, navnlig over for nukleotidkonfigurationer eller over for den strukturelle variation, der forekommer i naturen, eller som indføres kunstigt, enzymer, der er i stand til at
30 genkende molekylstrukturer og virke derpå, og enzymer, der har en biologisk funktion (se Tadahiko Ando, Chemistry and Life, 13, 6, p. 342, 1975).

Der er allerede blevet udført undersøgelser af enzymer, som har ført
35 til en fremgangsmåde til ud fra en bouillonkultur af Aspergillus oryzae at fremstille et enzym, som ikke virker på dobbeltstrenget DNA, men specifikt spalter enkeltstrenget DNA (se JP patent nr. 593.368), en fremgangsmåde til ud fra celler af Aspergillus oryzae at fremstille et enzym, der er i stand til fortrinvis at spalte en

purin-purinbinding i DNA-molekylet (se JP patent nr. 621.205), en fremgangsmåde til ud fra bakteriofaginficeret Escherichia coli at fremstille et enzym, der er i stand til at indføre brud i enkeltstrenget DNA (se JP patent nr. 764.919), en fremgangsmåde til ud fra Escherichia coli ved infektion eller induktion med bakteriofag at fremstille et enzym, der er i stand at virke på RNA og give cyklisk nukleosidphosphat (se JP patent nr. 829.334), en fremgangsmåde til ud fra en bouillonkultur af alkalofile bakterier at fremstille et enzym, der er i stand til fortrinsvis at spalte en guanin-guaninbinding i DNA-molekylet (se JP patent nr. 831.171), en fremgangsmåde til ud fra celler af Bacillus subtilis at fremstille et enzym, der er i stand til specifikt at nedbryde RNA-delen af DNA-RNA hybrid (se JP patent nr 877.668) og en fremgangsmåde til fremstilling af et enzym fra Bacillus subtilis eller en beslægtet stamme, der tilhører slægten Bacillus, hvilket enzym har substratspecificitet over for DNA, det vil sige den enzymegenskab at genkende en specifik nukleotidsekvens i deoxyribonukleinsyre og spalte dens bindinger til frembringelse af unikke fragmenter af deoxyribonukleinsyren; dette enzym genkender og spalter en specifik nukleotidfrekvens (se JP ansøgning nr. 121671/75 (fremlæggelsesskrift nr. 47980/77) og JP patentansøgning nr. 87883/76 (fremlæggelsesskrift nr. 15491/78)).

Mikroorganismer har en evne til specifikt at genkende og nedbryde fremmed DNA i cellen (restriktionssystem) og har også evne til at modificere sådant DNA, således at DNA'et udviser modstandsdygtighed over for dets eget restriktionssystem (modifikationssystem).

Restriktionsenzymet er en endonuklease, der deltager i dette restriktions-modifikationssystem, og restriktionsenzymet omfatter et enzym, der er i stand til at genkende en specifik sekvens på 4-6 nukleotider i et dobbeltstrenget DNA-molekyle og frembringe spaltning af sekvensen eller spaltning i nærheden af sekvensen.

I kraft af sådan substratspecificitet kan disse restriktionsenzymer effektivt udnyttes i studierne af primærstrukturer af DNA (nukleotidsekvens) og dets funktion og på in vitro rekombination af heterogent DNA.

Fra de hidtil kendte mikroorganismer har der ved dyrkningen af den

enkelte mikroorganisme almindeligvis kun kunnet udvindes et enkelt restriktionsenzym med væsentligt udbytte. Ved mange anvendelser er det imidlertid fordelagtigt at benytte to eller flere forskellige restriktionsenzymer samtidigt, men dette har i så fald hidtil krævet
5 sammenblanding af enzympræparater indvundet fra flere separate dyrkninger af forskellige mikroorganismer, og selv om der til en række anvendelser kun skal benyttes et enkelt restriktionsenzym, ville det ud fra et produktionsmæssigt synspunkt alligevel være fordelagtigt at kunne fremstille to eller flere restriktionsenzymer
10 samtidigt ved dyrkning af en enkelt mikroorganisme, idet arbejdet med indbyrdes adskillelse af de enkelte restriktionsenzymer ganske vist komplicerer det samlede oprensningsarbejde noget, men dette opvejes rigeligt af, at der kun skal foretages én dyrkning med de hertil hørende sædvanlige, omstændelige forberedelser, såsom rengø-
15 ring og sterilisering af produktionsanlæg og dyrkningsmedium samt fremstilling og propagering af en egnet monokultur af den omhandlede mikroorganisme.

Tilvejebringelse af en fremgangsmåde, ved hvilken det er muligt
20 samtidigt at fremstille mindst to deoxyribonukleaser ved dyrkning af en enkelt mikroorganisme i industriel målestok, ville derfor repræsentere et væsentligt fremskridt i flere henseender.

Dette er nu lykkedes med den indledningsvis angivne fremgangsmåde,
25 som ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at Bacillus subtilis ISMRB 9 (ATCC 31.526, FERM P 4543), Bacillus subtilis ISMRBE 17 (ATCC 31.522, FERM P 4381), Bacillus subtilis ISMBF 21 (ATCC 31.525, FERM P 4384), Bacillus subtilis ISE 15 (ATCC 31.527, FERM P 4380), Bacillus subtilis ISF 18 (ATCC 31.523, FERM P 4382) eller Bacillus
30 subtilis ISB 8 (ATCC 31.524, FERM P 4383), dyrkes i et næringsmedium, efterfulgt af opsamling af et cellefrit ekstrakt fra celler, der er opnået ved dyrkningen, og fraktionering og/eller separering af det cellefrie ekstrakt til opnåelse af mindst to af ovennævnte deoxyribonucleaser, som hver har forskellig substratspecificitet.

35 Mikroorganismene, der bruges ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, er nytransformerede stammer, der hører til slægten Bacillus, i hvilken der ved transformation er blevet introduceret en evne til at frembringe mere end én restriktionsendonuklease.

Udtrykket "transformation" betegner en fremgangsmåde ved hvilken en genetisk etableret mikroorganisme bruges som recipient, og recipienten kontaktes med DNA, der er fremstillet ud fra en mikroorganisme, som har et restriktions-modifikationssystem, der er forskelligt fra recipientens, til indføring af et nyt restriktions-modifikationssystem i recipienten.

Bacillus subtilis ISMRB 9, ISMRBE 17 og ISMBF 21 er blevet frembragt ved en fremgangsmåde, ved hvilken Bacillus subtilis marburg 168 (GSY 1026) som recipient udsættes for transformation med DNA fra Bacillus subtilis R til indføring af restriktions-modifikationssystemet fra stamme R i recipienten, og den fremkomne transformerede stamme ISMR 4 selekteres; som recipient udsættes den selekterede, transformerede stamme ISMR 4 for transformation med DNA fra Bacillus subtilis IAM 1247 til indføring af restriktions-modifikationssystemet fra stamme 1247 i recipienten, og den fremkomne transformerede stamme ISMRB 9 selekteres; som recipient udsættes den selekterede transformerede stamme ISMRB 9 for transformation med DNA fra Bacillus subtilis IAM 1231 til indføring af restriktions-modifikationssystemet fra stamme 1231, og de fremkomne transformerede stammer ISMRBE 17 og ISMBF 21 selekteres.

Den ovenfor nævnte transformerede stamme ISMRB 9 har de kombinerede restriktions-modifikationssystemer fra stammerne GSY 1026, R og IAM 1247. Ved dyrkning af den transformerede stamme ISMRB 9 kan der ud fra celler af den transformerede stamme ISMRB 9 fremstilles et restriktionsenzym Bsu R, der hører til stammen R, og et restriktionsenzym Bsu 1247 I, der hører til stammen IAM 1247.

Det er ligeledes blevet bekræftet, at den transformerede stamme ISMRBE 17 har de kombinerede restriktions-modifikationssystemer fra stammerne GSY 1026, R og IAM 1247 og et andet restriktions-modifikationssystem fra stammen IAM 1231, og at den transformerede stamme ISMBF har restriktions-modifikationssystemer fra stammerne GSY 1026 og IAM 1247 og et andet restriktions-modifikationssystem fra stammen IAM 1247.

De 3 restriktionsenzymer Bsu R, Bsu 1247 I og Bsu 1231 I, der hører til stammerne R, 1247 henholdsvis 1231, kan således fremstilles ved

dyrkning af ovennævnte transformerede stamme ISMRBE 17.

Tilsvarende kan restriktionsenzymene Bsu 1247 I og Bsu 1231 II, der hører til stammerne IAM 1247 og IAM 1231, fremstilles samtidig ved dyrkning af ovennævnte transformerede stamme ISMBF 21.

Bacillus subtilis ISE 15 og ISF 18 er blevet frembragt ved en fremgangsmåde, ved hvilken stammen GSY 1012, der hidrører fra ovenfor nævnte stamme GSY 1026, bruges som recipient og udsættes for transformation med DNA fra den ovenfor nævnte stamme IAM 1231 til indføring af restriktions-modifikationssystemet fra stammen IAM 1231, og de fremkomne transformerede stammer ISE 15 og ISF 18 selekteres derefter.

Den transformerede stamme ISE 15 har et første restriktions-modifikationssystem, der hører til stammen IAM 1231. Dette restriktionsenzym, Bsu 1231 I, der hører til stammen IAM 1231, kan fremstilles ud fra celler der er opnået ved dyrkning af den transformerede stamme ISE 15.

Den transformerede stamme ISF 18 har et andet restriktions-modifikationssystem, der hører til stammen IAM 1231. Dette restriktionsenzym, Bsu 1231 II, der hører til stammen IAM 1231, kan fremstilles ud fra celler, der er opnået ved dyrkning af den transformerede stamme ISF 18.

Bacillus subtilis ISB 8 er blevet frembragt ved en fremgangsmåde, ved hvilken stammen GSY 1012, der hidrører fra stammen GSY 1026, bruges som recipient og udsættes for transformation med DNA fra ovennævnte stamme IAM 1247 til indføring af restriktions-modifikationssystemet fra stammen IAM 1247 i recipienten, og den fremkomne transformerede stamme ISB 8 selekteres derefter. Denne transformerede stamme ISB 8 har et restriktions-modifikationssystem fra stammen IAM 1247.

Restriktionsenzymet Bsu 1247 I, der hører til stammen IAM 1247, kan fremstilles ud fra celler, der er opnået ved dyrkning af ovennævnte transformerede stamme ISB 8.

De transformerede stammer, der effektivt kan bruges ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, er (i) Bacillus subtilis ISMRB 9, (ii) Bacillus subtilis ISMRBE 17, (iii) Bacillus subtilis ISMBF 21, (iv) Bacillus subtilis ISE 15, (v) Bacillus subtilis ISF 18 og (vi) Bacillus subtilis ISB 8, og de er blevet deponeret hos Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japan (herefter kaldt "FERM") og American Type Culture Collection, 12301, Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, under følgende deponeringsnumre:

<u>Nr.</u>		<u>FERM-P Nr.</u>	<u>ATCC-Nr.</u>
	(i) <u>Bacillus subtilis</u> ISMRB 9	4543	31526
	(ii) <u>Bacillus subtilis</u> ISMRBE 17	4381	31522
15	(iii) <u>Bacillus subtilis</u> ISMBF 21	4384	31525
	(iv) <u>Bacillus subtilis</u> ISE 15	4380	31527
	(v) <u>Bacillus subtilis</u> ISF 18	4382	31523
	(vi) <u>Bacillus subtilis</u> ISB 8	4383	31524

De er deponeret hos ATCC uden restriktioner, hvilket tillader fuld offentlig adgang til kulturen, og ansøgeren vil opretholde deponeringen af ATCC 31526, 31522, 31525, 31527, 31523, 31524 uden restriktioner så længe et patent, der meddeles på ansøgningen, løber, og således vil mikroorganismestammerne være tilgængelige for enhver trediepart på et hvilket som helst tidspunkt så længe patentet løber.

Et eksempel på opnåelse af de ovenfor nævnte transformerede stammer ud fra mikroorganismer, der tilhører slægten Bacillus, vil nu blive beskrevet. Metoden til opnåelse af de transformerede stammer er selvfølgelig ikke begrænset til den ene, der er beskrevet nedenfor, og forskellige modifikationer og ændringer kan foretages i overensstemmelse med kendt teknik.

Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026 (ATCC nr. 31339, FERM-P nr.4216) blev som recipient dyrket ved 37°C under rystning i Bott's kulturmedie (sammensat af 50µg/ml af hver af histidin, tryptophan, arginin, valin, lysin, glysin, asparagin, methionin og threonin, 0,6% KH₂PO₄, 1,4% K₂HPO₄, 0,1% natriumcitrat, 0,2% ammoniumsulfat,

0,5% glucose og 6,5mM MgSO₄) kompletteret med 20 µg/ml af hver af adenin, leucin og methionin, indtil celleantallet var forøget til 4×10^8 per ml. Derefter blev 0,1 ml DNA (45 µg/ml) af Bacillus subtilis R (se S.Bron et al., Molec.Gen. Genet., 143, 13-23, 1975),
5 der er opnået ved phenolekstraktionsmetoden ved pH 9, sat til kulturmediet, og inkubation blev fortsat ved 37°C i 30 minutter under rystning. Kulturmediet blev fortyndet 10 gange med det samme kulturmedium, og inkubationen blev fortsat ved 30°C under rystning natten over. Kulturmediet blev fortyndet 100 gange med det samme
10 kulturmedium og en plade med et TYP kulturmedium (indeholdende 1% bactotrypton, 0,5% gærekstrakt, 1% NaCl og 1,5% agar), i hvilket der på forhånd var sået fag Φ105C 168, der er formeret af Bacillus subtilis marburg 168 GSY 1026, blev inokuleret med den ovenfor nævnte fortynding. Dyrkning blev udført ved 37°C natten over og en
15 koloni af den fremkomne transformerede stamme, der har en modstandsdygtighed overfor fag Φ105C 168 blev opsamlet. Således blev der opnået en transformeret stamme ISMR 4, der har et restriktions-modifikationssystem fra Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026 og Bacillus subtilis R.

20 En transformeret stamme ISMRB 9, der har restriktions-modifikationssystemerne fra Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026 og Bacillus subtilis R og et restriktions-modifikationssystem fra Bacillus subtilis IAM 1247, kan opnås og separeres ifølge den ovenfor nævnte
25 fremgangsmåde under udnyttelse af den ovenfor nævnte transformerede stamme ISMR 4 som en recipient og DNA Bacillus subtilis IAM 1247.

Ydermere kan en transformeret stamme ISMRBE 17, der har restriktions-modifikationssystemerne fra Bacillus subtilis marburg 168GSY
30 1026, Bacillus subtilis R og Bacillus subtilis IAM 1247 og Bacillus subtilis IAM 1231, og en transformeret stamme ISMBF 21, der har restriktions-modifikationssystemerne fra Bacillus subtilis 168GSY 1026, Bacillus subtilis IAM 1231 og Bacillus subtilis IAM 1247, opnås ifølge den ovenfor nævnte fremgangsmåde under udnyttelse af
35 den ovenfor transformerede stamme ISMRB 9 som en recipient og DNA Bacillus subtilis IAM 1231.

Endnu yderligere kan en transformeret stamme ISE 15, der har det første restriktions-modifikationssystem fra Bacillus subtilis IAM

1231, og en transforemret stamme ISF 18, der har det andet restriktions-modifikationssystem fra Bacillus subtilis IAM 1231, opnås ifølge den ovenfor nævnte fremgangsmåde ved brug af Bacillus subtilis 168GSY 1012, der hidrører fra Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026, som en recipient og DNA fra Bacillus subtilis IAM 1231.

Endvidere kan en transformeret stamme ISB 8, der har restriktions-modifikationssystemet fra Bacillus subtilis IAM 1247, opnås ifølge den ovenfor nævnte fremgangsmåde ved brug af stammen 168GSY 1012 som en recipient og DNA fra Bacillus subtilis IAM 1247.

Hver af de forudgående transformerede stammer (i) til (iv) opnås ved indføring af et restriktions-modifikationssystem fra en kendt stamme, der hører til slægten Bacillus, ind i Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026 eller Bacillus subtilis marburg 168GSY 1012, der hidrører fra stammen 168GSY 1026, ved at bruge DNA fra den kendte stamme. De basale mikrobiologiske egenskaber hos disse transformerede stammer er de samme som egenskaberne hos den basale recipient, dvs. Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026.

De karakteriske mikrobiologiske egenskaber hos denne stamme 168GSY 1026, der er bestemt ifølge fremgangsmåderne, der er beskrevet af R.E.Gordon, W.C.Haymes og C. H-N. Pang i "The Genus Bacillus", U.S.Dept. Agr.. 1974 og "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 1974 er som følger.

(A) Morfologi:

Stammen er en vegetativ stavbakterie, der har peritrikke flageller og udviser en bevægende egenskab. Størrelsen $(0,7-0,9\mu\text{m}) \times (1,8-3,0\mu\text{m})$.

Den er grampositiv.

(B) Vækst på kulturmedier:

- (1) Bouillon-agar pladekultur: god vækst.
- (2) Bouillon-agar udstrygningskultur: god vækst.
- (3) Bouillon flydende kultur: god vækst.

- (4) Glucose bouillon kultur: god vækst.
- (5) Glucose bouillon-agar kultur: mere spredning og jævn vækst end i bouillon-agar kultur.

5 (C) Fysiologiske egenskaber.

- (1) Vækstbetingelser:
 - Temperatur: 18-50°C
 - Optimumtemperatur: 30-45°C
 - 10 pH: 5 til 8
 - Optimalt pH: 7,0 - 7,5
- (2) Nitratreduktion: positiv
- (3) Hydrolyse af gelatin og kasein: positiv.
- (4) Hydrolyse af stivelse: positiv.
- 15 (5) Saltmodstandsdygtighed: god vækst i 5% NaCl-opløsning.
- (6) Iltkrav: aerob.

Når ovennævnte bakteriologiske egenskaber undersøges under henvisning til ovennævnte litteraturreferencer og "Transformation and
20 Transduction in Defective Mutants of Bacillus subtilis", Journal of Bacteriology, 93, 1925-1937, 1967, bekræftes det, at mikroorganismen er en kendt marburg stamme, der tilhører Bacillus subtilis.

Resultaterne af undersøgelser, der er foretaget med restriktions-
25 modifikationssystemer fra de førnævnte transformerede stammer (i) til (vi) under brug af fag Ø105C anføres i tabel 1.

30

35

Tabel 1

Transformeret stamme	restriktions- modifikations- system.	Indført restriktions-modifikationssystemer fra andre <u>Bacillus</u> stammer.						
		168	R	1247 I	1247 II	1231 I	1231 II	
ISMR 4	restriktion modifikation	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	-	-	-	-	-
ISMRB9	restriktion modifikation	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	-	-	-	-
ISMRBE 17	restriktion modifikation	+	+	+	-	+	-	-
		+	+	+	-	+	-	-
ISMBF 21	restriktion modifikation	+	-	+	-	-	+	+
		+	-	+	-	-	-	+
ISE 15	restriktion modifikation	-	-	-	-	+	-	-
		+	-	-	-	+	-	-
ISF 18	restriktion modifikation	-	-	-	-	-	+	+
		+	-	-	-	-	-	-
ISB 8	restriktion modifikation	-	-	+	-	-	-	-
		+	-	+	-	-	-	-

Dyrkning af førnævnte transformerede stammer (i) til (vi) kan udføres ifølge kendte dyrkningsmetoder. En typisk dyrkningsmetode vil nu blive beskrevet.

- 5 Et kulturmedium, der indeholder aminosyrer, et kaseinnedbrydningsprodukt, glucose, et phosphat, et sulfat, gærekstrakt og lignende inokuleres ved den transformerede stamme, og dyrkning udføres ved 30 - 37°C med gennemluftning og rystning. Cellerne opsamles under en periode, der ligger fra den logaritmiske fase til begyndende stationære fase. Cellerne udsættes for ultralydspulverisation og centrifugalseparation sådan som de foreligger eller efter, at de har været udsat for lysosymbehandling til frembringelse af protoplaster, hvorved opnås et cellefrit ekstrakt. Det opnåede cellefrie ekstrakt fraktioneres og streptomycinsulfatbehandles. Mindst 2 endonuklease-
- 10 typer DNA-nedbrydende enzymer, der adskiller sig i substratspecificitet, hvilke enzymer er udvalgt blandt de ovenfor nævnte Bsu R, Bsu 1247 I, Bsu 1231 I og Bsu 1231 II, opnås samtidigt efter passende oprensning, såsom ved gelfiltrering ved brug af Ultragel ACA 44 eller Sephadex G-100, ionbytningsskromatografi ved brug af DEAE cellulose eller phosphocellulose eller en kombination heraf.
- 15 20

Hvert af enzymerne, der er opnået ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, er en kendt endonuklease DNA-nedbrydende enzyntype.

25

Fysisk-kemiske egenskaber af disse enzymer vil nu blive beskrevet.
(Fysisk-kemiske egenskaber af enzymer)

(1) Måling af endonukleaseaktivitet:

30

- Fag ϕ 105C formeres i en værtstamme og fag ϕ 105C DNA, som er undergået værtsafhængig modifikation, separeres og frembringes. Dette fag ϕ 105C DNA bruges som et substrat til måling af den enzymatiske aktivitet. Mere specifikt bruges som substrater fag ϕ 105C DNA, der er dannet ved hjælp af Bacillus subtilis marburg 168GSY 1026 som værtstammen og fag ϕ 105C DNA, der er dannet ved hjælp af den transformerede stamme ISMRB 9 som værtstammen.
- 35

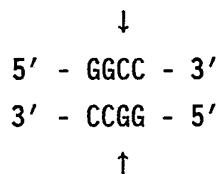
En enzymatisk reaktionsvæske, der omfatter 0,1 μ g af substrat DNAet,

50mM tris-HCl puffer opløsning (pH = 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1% gelatine og en enzymprøve, behandles ved 37°C i 50 minutter, 30 µl af den fremkomne væskereaktionsblanding udsættes for elektroforese ved 110V i 1,5 til 2 timer ved at bruge en plade, der indeholder 1% agarose gel, og dyppes i en opløsning, der indeholder 0,5µg/ml ethidiumbromid, og fluorescensen fotograferes under bestråling med ultraviolette stråler. Restriktionsenzymaktiviteten bestemmes på basis af positionen og antallet af DNA-fragmenter, der påvises i det opnåede foto.

(2) Enzymegenskaber (substratspecificitet):

(a) Restriktionsenzym Bsu R:

Dette enzym spalter DNA separeret fra Bacillus subtilis R. Det genkender den følgende nukleotidsekvens i DNA-molekylet:

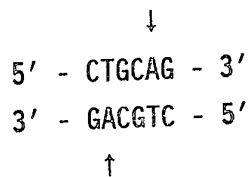


og spalter sekvensen ved pilen ↓.

Yderligere spalter dette enzym SV40 DNA (tumor virus (Simian Virus 40)) 18 steder, λfag DNA mere end 200 steder, λ dv DNA 14 steder og fag SPP1 DNA mere end 80 steder (se S. Bron, K. Murray og T. A. Trautner, Mol. Gen. Genet., 143, 13 (1975), S. Bron og K. Murray, Mol. Gen. Genet., 143, 25 (1975) og Tadahiko Ando og Takahiko Shibata, Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, 22, (8), 1012 (1977)).

(b) Restriktionsenzym Bsu 1247 I:

Dette enzym spalter DNA separeret fra Bacillus subtilis IAM 1247. Det genkender følgende nukleotidsekvens i DNA molekylet:



5

og spalter sekvensen ved pilen ↓.

10 Enzymet spalter λ fag DNA 18 steder, SV40 DNA 3 steder, og fag Φ105C DNA et ukendt antal steder (se T. Shibata, S. Ikawa, C. Kim og T. Ando, J. Bacteriol., 128, 473 (1976), Tadahiko Ando og Takehiko Shibata, Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, 22 (8), 1012, (1977) og JP ansøgning nr. 87883/76 (offentliggørelsesskrift nr. 15491/78)).

15

(c) Restriktionsenzym Bsu 1231 I:

20 Dette enzym spalter DNA separeret fra Bacillus subtilis IAM 1231. Nukleotidsekvensen, der spaltes i DNA-Molekylet af dette enzym, er ukendt. Det er imidlertid blevet bekræftet, at dette enzym spalter λ fag DNA, fag Φ105C DNA og fag SPP1 DNA (se T. Shibata, S. Ikawa, C. Kim og T. Ando, J. Bacteriol., 128, 473 (1976), Tadahiko Ando og Takehiko Shibata, Proteins, Nucleic Acids and Enzymes, 22 (8), 1012, (1977) og JP ansøgning nr. 87883/76 (offentliggørelsesskrift nr. 25 15491/78)).

(d) Restriktionsenzym Bsu 1231 II:

30 Dette enzym spalter DNA separeret fra Bacillus subtilis IAM 1231. Nukleotidsekvensen, der spaltes i DNA-molekylet af dette enzym, er ukendt. Det er imidlertid blevet bekræftet, at dette enzym spalter fag Φ105C DNA ca. 15 steder, λfag DNA ca. 15 steder, fag ΦX174 DNA ca. 5 steder og ColEI, (plasmid (cellulær intrinsisk faktor fra Escherichia coli)) ca. 9 steder.

35

De førnævnte enzymer, der er opnået ifølge den foreliggende opfindelse, er meget værdifulde som biokemiske reagenser til opklaring af genernes DNA-struktur og funktion og molekylær kloning af generne.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse vil nu blive beskrevet i detaljer under henvisning til følgende eksempler.

Eksempel 1.

5

Den tranformerede stamme ISMRB 9 (ATCC 31526) blev fordyrket ved 37°C natten over i 1 liter Bact-Penecillium Broth medium (der indeholder 1,5% oksekødsekstrakt, 1,5% gærekstrakt, 5% pepton, 1% glucose, 3,5% NaCl, 3,68% K₂HPO₄ og 1,32% KH₂PO₄). Kultursuppen blev overført
10 til 10 liter af et tryptonsupplemedium (der indeholder 1% trypton, 5% gærekstrakt og 10% NaCl) og dyrkning blev udført ved 37°C i 4-5 timer under gennemluftning og rystning. Celler i begyndelsesstadiet af stationær væksthase blev opsamlet ved centrifugal separation og 30 g af cellerne blev suspenderet i 50 ml pufferopløsning A (der
15 indeholder 10mM tris-HCl pufferopløsning (pH = 7,5), 0,1 mM EDTA og 5 mM mercaptoethanol). Den fremkomne suspension blev blandet med glasperler (diameter = 0,1 mm), og pulveriseringsbehandling blev udført ved 0°C i 15 minutter, og den pulveriserede suspension blev centrifugeret i 10 minutter ved 10.000 omdr./min.

20

Til den opnåede supernatantvæske blev sat en 1% opløsning af streptomycinsulfat, og blandingen blev fraktioneret i bundfaldet og supernatantvæsken ved centrifugalseparation. Den bundfældede fraktion blev suspenderet i den ovenfor nævnte pufferopløsning A til
25 hvilken der var blevet sat 0,2 M MgCl₂, og en suspension, der indeholder restriktionsenzymet Bsu R, blev opnået.

Ammoniumsulfat blev sat til streptomycinsupernatantvæsken til en koncentration, der svarer til 40-80% mætning, og det fremkomne
30 bundfald blev suspenderet i pufferopløsning A og dialyseret mod pufferopløsning A. Dialysefraktionen blev ført gennem en søjle, der er pakket med AcA 34 (2,2 cm x 58 cm) og eluering blev udført under anvendelse af en pufferopløsning, der indeholder 1% glycerin og 0,3 M NaCl, og aktiviteten Bsu 1247 I blev påvist i 150-220 ml af
35 eluatet.

Yderligere blev dialysen udført ved brug af en pufferopløsning, der indeholder 10% glycerin, og dialysefraktionen blev ført gennem en adsorptionssøjle, der er pakket med DE 52. Elueringsbehandling blev

udført under anvendelse af pufferopløsning A, der indeholder 10% glycerin og har en lineær NaCl-koncentrationsgradient på fra 0 til 0,5 M. Renset Bsu 1247 I blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret med pufferopløsning A ved en NaCl-koncentration på 0,12 til 0,2 M.

Eksempel 2

Den transformerede stamme ISMRBE 17 (ATCC nr. 31522) blev dyrket og behandlet på samme måde som beskrevet i eksempel 1, og fraktionen, der indeholder restriktionsenzymet Bsu R blev opsamlet fra fraktionen bundfældet med streptomycin.

Streptomycinsupernatantvæsken blev behandlet på samme måde som i eksempel 1, og aktiviteterne af restriktionsenzymene Bsu 1247 I og Bsu 1231 I blev påvist i 150 til 220 ml af det opnåede eluat. Denne fraktion blev dialyseret mod pufferopløsning A, der indeholder 10% glycerin og dialysefraktionen blev ført gennem en adsorptionssøjle, der er pakket med DEAE cellulose og DE 52. Eluering blev udført med pufferopløsningen A, der indeholder 10% glycerin og har en lineær NaCl-koncentrationsgradient på fra 0 til 0,5 M. Fraktionen, der blev elueret med pufferopløsningen A ved en NaCl-koncentration på fra 0,12 til 0,2 M, blev opsamlet og dialyseret mod en 10mM kaliumphosphatpufferopløsning (pH = 6,8), der indeholder 10% glycerin, 0,1 mM EDTA og 5 mM 2-mercaptoethanol. Dialysefraktionen blev adsorberet på en søjle, der er pakket med phosphocellulose p-11 og eluering blev udført med en opløsning af KCl, der har en lineær koncentrationsgradient på fra 0 til 0,6 M. Bsu 1247 I blev opsamlet i fraktion, der blev elueret med KCl-opløsningen, der har en koncentration på fra 0,22 til 0,32 M, og Bsu 1231 I blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret af KCl-opløsningen, der har en koncentration på fra 0,20 til 0,38 M.

Eksempel 3

Den transformerede stamme ISMBF 21 (ATCC nr. 31.525) blev dyrket og behandlet på samme måde som i eksempel 1 til opnåelse af en streptomycinsupernatantvæske. Aktiviteterne af restriktionsenzymene Bsu 1247 I og Bsu 1231 II blev påvist i 150 til 220 ml af en fraktion,

der er opnået ved behandling af streptomycinsupernatantvæsken på samme måde som i eksempel 1. Den således opnåede fraktion blev behandlet på samme måde som i eksempel 2. Mere specifikt blev fraktionen dialyseret mod pufferopløsningen A, der indeholder 10% glycerin, og adsorberet i en søjle, der er pakket med DEAE cellulose og DE 52. Eluering blev udført under anvendelse af pufferopløsningen A, der indeholder 10% glycerin, og som har en lineær NaCl-koncentrationsgradient på fra 0 til 0,5 M og fraktionen, der blev elueret af pufferopløsningen A, der har en koncentration på fra 0,12 til 0,2 M blev opsamlet. Fraktionen blev yderligere dialyseret mod en 10 mM kaliumphosphatopløsning (pH = 6,8), der indeholder 10% glycerin, 0,1 M EDTA og 5 mM 2-mercaptoethanol. Dialysefraktionen blev adsorberet i en søjle pakket med phosphocellulose P-11, og eluering blev udført med en KCl-opløsning, der har en lineær koncentrationsgradient på fra 0 til 0,8 M. Renset Bsu 1231 II blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret med KCl-opløsningen, der har en koncentration på fra 0,65 til 0,75 M, og rensat Bsu 1247 I blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret med KCl-opløsningen, der har en koncentration på fra 0,22 til 0,32 M.

Eksempel 4

Den transformerede stamme ISE 15 (ATCC nr. 31.527) blev dyrket og behandlet på samme måde som i eksempel 1 til opnåelse af en streptomycinsupernatantvæske. Aktiviteten af restriktionsenzymet Bsu 1231 I blev påvist i 150 til 220 ml af en fraktion, der blev opnået ved behandling af streptomycinsupernatantvæsken på samme måde som i eksempel 1. Fraktionen blev behandlet på samme måde som i eksempel 1. Mere specifikt blev fraktionen dialyseret mod pufferopløsningen A, der indeholder 10% glycerin, og derefter adsorberet i en søjle pakket med DE 52. Eluering blev udført under anvendelse af pufferopløsning A, der indeholder 10% glycerin og har en lineær NaCl-koncentrationsgradient på fra 0 til 0,5M. Renset Bsu 1231 I blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret med pufferopløsningen A, der har en NaCl-koncentration på fra 0,12 til 0,18 M.

Eksempel 5.

Den transformerede stamme ISF 18 (ATCC nr. 31523) blev dyrket og

behandlet på samme måde som i eksempel 4. Renset Bsu 1231 II blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret med pufferopløsningen A, der har en NaCl-koncentration på fra 0,20 til 0,30 M.

5 Eksempel 6.

Den transformerede stamme ISB 8 (ATCC nr 31524) blev dyrket og behandlet på samme måde som i eksempel 4. Renset Bsu 1247 I blev opsamlet i fraktionen, der blev elueret med pufferopløsningen A, der har en NaCl-koncentration på fra 0,12 til 0,20 M.

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af mindst to deoxyribonukleaser
5 udvalgt blandt Bsu R, Bsu 1247 I, Bsu 1231 I og Bsu 1231 II, k e n d e t e g n e t ved, at Bacillus subtilis ISMRB 9 (ATCC 31.526, FERM P 4543), Bacillus subtilis ISMRBE 17 (ATCC 31.522, FERM P 4381), Bacillus subtilis ISMBF 21 (ATCC 31.525, FERM P 4384), Bacillus subtilis ISE 15 (ATCC 31.527, FERM P 4380),
10 Bacillus subtilis ISF 18 (ATCC 31.523, FERM P 4382) eller Bacillus subtilis ISB 8 (ATCC 31.524, FERM P 4383), dyrkes i et næringsmedium, efterfulgt af opsamling af et cellefrit ekstrakt fra celler, der er opnået ved dyrkningen, og fraktionering og/eller separering af det cellefrie ekstrakt til opnåelse af mindst to af ovennævnte deoxyri-
15 bonukleaser, som hver har forskellig substratspecificitet.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at cellerne opnås under en periode, der ligger fra sen logaritmisk vækstfase til begyndende stationær vækstfase.
- 20 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at fraktionerings- og/eller separationsbehandlingen omfatter en behandling udvalgt blandt streptomycinbehandling, ammoniumsulfatfraktionering, ionbytningskromatografi, gelfiltrering og affinitetskromato-
25 grafi.

30

35