



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 264 231 A1

4(51) C 12 N 15/00
C 12 Q 1/70

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 307 034 4

(22) 17.09.87

(44) 25.01.89

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, Berlin, 1080, DD

(72) Barcak, Gerard J., Dr. rer. nat., US; Krüger, Detlev H., Prof. Dr. sc. med., DD; Pein, Claus-Dieter, Dr. rer. nat., DD; Reuter, Monika, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Spaltung resistenter DNA mit Restriktionsendonukleasen

(55) Gentechnik DNA, Restriktionsendonuklease, Erkennungsorte in DNA-Molekülen, Bakteriophagen, EcoRII, Plasmid, Oligonukleotide

(57) Verfahren zur Spaltung resistenter DNA mit Restriktionsendonukleasen. Die Erfindung findet auf dem Gebiet der Gentechnik Anwendung und hat das Ziel, ein einfaches Verfahren zur ortsspezifischen Spaltung resistenter DNA-Species durch Restriktionsendonukleasen zu entwickeln. Die Aufgabe besteht darin, resistente DNA's, die sich bisher noch nicht durch Restriktionsendonukleasen spalten lassen, an den Erkennungsorten zu schneiden. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß eine resistente DNA (DNA I) in Gegenwart einer zweiten DNA (DNA II, z. B. Plasmid-DNA, Bakteriophagen-DNA, Oligonukleotid-)Duplices mit einer Restriktionsendonuklease unter den an sich bekannten Reaktionsbedingungen der Gentechnik inkubiert wird. Sehr günstig erweist sich die Spaltung der DNA's des Bakteriophagen T3 und T7 mit der Restriktionsendonuklease EcoRII.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Spaltung resistenter DNA mit Restriktionsendonukleasen, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine resistente DNA (DNA I) mit einer zweiten empfindlichen DNA-Species (DNA II) in Gegenwart einer Restriktionsendonuklease den an sich bekannten Reaktionsbedingungen inkubiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als DNA I vorrangig die DNA's der Bakteriophagen T3 und T7 eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als DNA II biologisch replizierte DNA's eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß vorrangig Plasmid pBR322 und Phagen lambda eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als DNA II synthetisch hergestellte Oligonukleotid-Duplices eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Restriktionsendonuklease vorrangig EcoRII eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur in-vitro-Spaltung von refraktären DNA-Species. Es ist somit anwendbar auf dem Gebiet der Gentechnologie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die ortsspezifische Spaltung von DNA-Molekülen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist eine Basismethode der Gentechnik. Auf diese Weise lassen sich definierte DNA-Fragmente gewinnen, die weiter analysiert oder gentechnisch neu rekombiniert werden. Das normale Vorgehen besteht in der in vitro-Inkubation von gereinigter DNA mit der Restriktionsendonuklease bei 37°C (oder in einigen Fällen bei höheren Temperaturen) in Gegenwart von für jede Restriktionsendonuklease charakterischen Salz- und Kofaktorkonzentrationen bei entsprechendem pH-Wert (MANIATIS et al., Molecular Cloning — A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1982). Voraussetzung für die ortsspezifische Spaltung der DNA ist, daß die jeweiligen DNA-Moleküle die entsprechenden Erkennungsorte (spezifischen Basensequenzen) für die verwendete Restriktionsendonuklease besitzen. Es ist jedoch bekannt, daß DNA-Moleküle trotz des Besitzes solcher Erkennungsorte gegen die Restriktionsendonuklease resistent sein können (KRÜGER und BICKLE, Microbiol. Reviews 47, 345-360 [1983]). Ein bekanntes Verfahren zur Spaltung solcher zunächst resistenten DNA mit Restriktionsendonukleasen existiert in den Fällen, wo die Resistenz der Erkennungsorte durch Methylierung oder anderweitige Abänderung der DNA-Basen (modifizierte oder sogenannte „seltene“ Basen) in oder in der Nähe der Erkennungssequenz bedingt ist. In solchen Fällen läßt sich spaltbare DNA gewinnen, indem man diese vor der Isolierung und Restriktionsendonuklease-Behandlung in solchen Zellen vermehrt, in denen die Synthese von veränderten DNA-Basen nicht möglich ist. Die auf diese Weise vermehrte DNA, die nur die üblichen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin enthält, läßt sich dann normal mit Restriktionsendonukleasen spalten (KRÜGER und BICKLE, siehe oben). Die Resistenz von DNA-Erkennungsorten gegenüber Restriktionsendonukleasen ist aber nur in einem Teil der Fälle durch die Existenz von modifizierten bzw. seltenen Basen in der DNA bedingt. Aus der Literatur ist bekannt, daß auch Erkennungsorte, die die üblichen DNA-Basen enthalten, gegen Restriktionsendonukleasen resistent sein können. Die molekularen Ursachen dafür sowie praktische Möglichkeiten, zu ihrer Überwindung waren bisher nicht bekannt (KRÜGER und BICKLE, s. o.). Die vorliegende Erfindung schafft eine solche praktikable Möglichkeit.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, um resistente DNA-Species auf einfache Weise ortsspezifisch durch Restriktionsendonukleasen zu schneiden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Spaltung resistenter DNA mit Restriktionsendonukleasen zu entwickeln, die sich bisher nicht spezifisch durch Restriktionsendonukleasen spalten lassen. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst, indem die Spaltung der resistenten DNA (DNA I) durch die Restriktionsendonuklease in Gegenwart einer zweiten, empfindlichen DNA-Species (DNA II) durchgeführt wird. Sowohl DNA I als auch DNA II besitzen Erkennungsorte für die Restriktionsendonuklease, wobei unter den üblichen experimentellen Bedingungen (MANIATIS et al., siehe oben) bei Inkubation der Restriktionsendonuklease mit jeweils einer der beiden DNA-Species die DNA I resistent ist, die DNA II aber normal ortsspezifisch spaltbar ist.

Das einfache und ökonomische Prinzip der Erfindung besteht darin, daß DNA I unter den üblichen, für die jeweilige Restriktionsendonuklease charakteristischen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Puffer- und Kofaktorkonzentrationen, Zeitdauer der Inkubation) mit der Restriktionsendonuklease inkubiert wird (MANIATIS et al., s.o.), wobei entsprechend dem Wesen der Erfindung diese Inkubation in Gegenwart von DNA II ausgeführt wird. Das mengenmäßige Verhältnis von DNA II zu DNA I ist so zu gestalten, daß die Gesamtzahl von Restriktionsendonuklease-Erkennungsorten, die in der DNA II lokalisiert sind, mindestens so hoch oder höher ist als die Gesamtzahl der Erkennungsorte in der eingesetzten DNA I.

Als DNA II können sowohl biologisch replizierte DNA's als auch synthetisch hergestellte Oligonukleotid-Duplices eingesetzt werden. Nach Beendigung der Koinkubation beider DNA-Species und der Restriktionsendonuklease werden die entstandenen DNA-Fragmente durch Agarose- oder Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA im Gel wird durch Äthidiumbromid angefärbt und mittels UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

Als sehr vorteilhaft hat sich das Verfahren im Falle der Spaltung der DNA's der Bakteriophagen T3 und T7 durch die Restriktionsendonuklease *EcoRII* erwiesen. Beide DNA's sind normalerweise trotz Besitz von *EcoRII*-spezifischen Erkennungsorten gegenüber dieser Restriktionsendonuklease resistent. In Gegenwart von sensibler DNA II, wie zum Beispiel der DNA des Plasmids pBR322 oder der Phagen λ (die keine Cytosin-Methylierung tragen) bzw. von synthetischen, *EcoRII*-Erkennungsorte enthaltenden Oligonukleotid-Duplices, können auch T3- und T7-DNA sequenzspezifisch durch *EcoRII* geschnitten werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels erläutert.

Beispiel 1

Die DNA der Bakteriophagen T3 besitzt 3 Erkennungsorte für die Restriktionsendonuklease *EcoRII*, die zwar durch die isoschizomere Restriktionsendonuklease *BstNI* gespalten werden, nicht aber durch *EcoRII*. Die Resistenz der *EcoRII*-Erkennungsorte in der T3-DNA beruht nicht auf dem Vorliegen modifizierter DNA-Basen (KRÜGER et al., Eur. J. Biochem. 150/1985/ 323-330). Koinkubation der T3-DNA mit der DNA des Plasmids pBR322 (das aus *Escherichia coli* *dcm*⁻ Zellen isoliert wurde und dessen 6 Erkennungsorte durch *EcoRII* normal gespalten werden) in Gegenwart von *EcoRII* führt auch zu spezifischen *EcoRII*-Spaltung der Erkennungsorte in der T3-DNA.

In einem Reaktionsansatz werden 400 ng T3-DNA, 400 ng pBR322 DNA (aus *dcm*⁻ Zellen gewonnen) und 3 Einheiten *EcoRII* in 20 µl Reaktionspuffer mit den Endkonzentrationen 50 mM Tris-HCL (pH 7,4), 50 mM KCL, 50 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT bei einer Temperatur von 37°C für 60 min inkubiert.

Nach Abstoppen der Reaktion (5 min Inkubation bei 65°C) erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Sichtbarmachung der Fragmente durch UV-Bestrahlung nach Äthidiumbromid-Behandlung des Gels.