



**Ausschliessungspatent**

ISSN 0433-6461

(11)

**208 988**

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) C 12 N 15/00

**AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2367 408  
(31) 225.287

(22) 14.01.82  
(32) 15.01.81

(44) 18.04.84  
(33) US

(71) siehe (73)

(72) MIELENZ, JONATHAN R.; MICKEL, SUSAN; US: .....

(73) CPC INTERNATIONAL INC, NEW JERSEY, US

(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN) 60256/18/39 1020 BERLIN WALLSTR. 23/24

(54) **VERFAHREN ZUM AUFBAU EINES CHIMAEREN PLASMIDS MIT EINER GENKODIERUNG FUER EINE  
THERMOSTABILE ALPHA-AMYLASE**

(57) Die Erfindung betrifft ein chimarisches Plasmid mit einer Genkodierung für eine thermostabile Alpha-Amylase für das Klonen des Gens in Escherichia coli oder Bacillus subtilis für die Verwendung der daraus resultierenden Mikroorganismen bei der Produktion eines hitzebeständigen Alpha-Amylase-Enzyms, beispielsweise für die Herstellung von glukoschattigen Sirupen aus Maisstärke. Erfindungsgemäß wird das chimarische Plasmid mit einer Genkodierung für eine thermostabile Alpha-Amylase, welche durch Abschneiden von DNS von einem Donator und Kombinieren der resultierenden DNS-Fragmente mit einem in ähnlicher Weise zerschnittenen Vektor hergestellt wird, in der Weise hergestellt, daß der Donator ein natürlich vorkommendes Plasmid ist, das eine Genkodierung für eine thermostabile Alpha-Amylase enthält.

Berlin, den 21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

## Chimärisches Plasmid

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf chimärische Plasmide, die ein ein hitzbeständiges Alpha-Amylase-Enzym codierendes Gen enthalten sowie auf ein Verfahren zu deren Herstellung. Desgleichen beschrieben werden das Klonen des Gens in Escherichia coli oder Bacillus subtilis sowie die Verwendung der daraus resultierenden Mikroorganismen bei der Produktion eines hitzebeständigen Alpha-Amylase-Enzyms.

### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Große Mengen glukosehaltiger Sirupe werden durch die enzymatische Hydrolyse von Maisstärke erzeugt. Als erster Schritt dieses Verfahrens erfolgt gewöhnlich die Behandlung einer Stärke-Wasser-Mischung mit einem Alpha-Amylase-Enzym bei einer Temperatur nahe dem Siedepunkt von Wasser. Eine hitzebeständige Alpha-Amylase ist bei diesen Temperaturen am wirksamsten. Aus diesem Grunde besteht ein starker Anreiz, eine kostengünstige Quelle für ein derartiges hitzebeständiges Enzym zu gewinnen.

Die industriell genutzten Alpha-Amylasen werden durch verschiedene Mikroorganismen erzeugt. Es ist bekannt, daß diese Mikroorganismen genetisches Material enthalten, welches die Enzymproduktion durch den Organismus codiert. Dieses genetische Material liegt innerhalb der Zelle in Form von Desoxyribonukleinsäure - im folgenden als DNS bezeichnet - vor.

236740 8

-2-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Der größte Teil des genetischen Materials in einem Bakterium besteht aus DNS-Riesenmolekülen, welche als das Chromosom der Zelle vorliegen. Eine bestimmte Menge des genetischen Materials kann jedoch auch in Gestalt kleinerer, geschlossen kreisförmiger DNS-Moleküle - sogenannter Plasmide - vorhanden sein.

Mittels der als genetic engineering bezeichneten Techniken ist es möglich, einen Teil der DNS von einem Organismus zu einem anderen zu übertragen. Verschiedene Forscher haben versucht, diese Techniken zur Entwicklung von Mikroorganismen anzuwenden, die als überragende Alpha-Amylase-Erzeuger gelten können.

Eine dieser bereits in Anwendung gebrachten Techniken besteht darin, von einem als Amylaseerzeuger bekannten Mikroorganismus die gesamte DNS - d. h. chromosomale plus Plasmid-DNS - zu entfernen. Fragmente dieser DNS werden sodann mit der DNS eines Bakteriophagen verknüpft. Der diese kombinierte DNS enthaltende Bakteriophage wird nun dazu verwendet, einen anderen Mikroorganismus zu infizieren, wobei er dieses genetische Material auf die chromosomale DNS des Mikroorganismus überträgt. Jene Zellen des infizierten Organismus, die DNS mit einem Amylasegen in einer aktiven Form erhalten, werden zu Amylaseerzeugern. Diese Zellen können selektiert und für den weiteren Einsatz kultiviert werden.

Darüber hinaus beinhaltet das hinsichtlich hitzebeständiger Alpha-Amylasen angewendete genetic engineering

eine Technik, die aus dem Extrahieren der gesamten DNS aus einem als Erzeuger solcher Amylasen bekannten Mikroorganismus besteht. Einige Fragmente der DNS werden in einen neuen Wirts-Mikroorganismus trans-

236740 8

-3-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

formiert, wobei sie in das Chromosom dieses Wirtsorganismus eingefügt werden. Einige jener Zellen, in welche DNS mit aktivem amylsasecodierendem genetischem Material eingefügt worden ist, werden dann selektiert und angebaut.

Nunmehr hat es sich gezeigt, daß DNS, welche eine hitzebeständige Alpha-Amylase codiert, in einem natürlich vorkommenden Plasmid existieren kann. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß derartiges natürlich vorkommendes genetisches Material, welches ein Gen enthält, das hitzebeständige Alpha-Amylase codiert, direkt mit einem als Plasmidvektor bekannten anderen Plasmid kombiniert werden kann, um auf diese Weise ein synthetisches Plasmid zu ergeben, das im folgenden als chimärisches Plasmid bezeichnet wird. Dieses chimärische Plasmid kann in einen neuen Wirts-Mikroorganismus eingelagert und dort vervielfacht werden. Dies nun gestattet die Entwicklung von in überragendem Maße Alpha-Amylase erzeugenden Mikroorganismen, welche ohne weiteres auf industrieller Grundlage angebaut werden können. Die vorliegende Erfindung richtet sich auf den Einsatz der neuentdeckten, natürlich vorkommenden, Alpha-Amylase-Gene enthaltenden Plasmide, auf die Bildung von chimärischen Plasmiden, die deren genetisches Material enthalten, sowie auf die Entwicklung neuer Mikroorganismen, die diese chimärischen Plasmide enthalten.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Mikroorganismus, der ein überragender Erzeuger eines thermostabilen Alpha-Amylase-Enzyms ist und kommerziell einfach gezüchtet werden kann.

236740 8

-4-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Stamm eines einfach gezüchteten Mikroorganismus zu ändern, so daß er eine große Menge eines thermostabilen Alpha - Amylase - Enzyms herstellen kann.

Erfindungsgemäß wird dieses Problem durch "genetic engineering" (künstliche genetische Modifikation) gelöst, um genetisches Material in den Bacillus subtilis einzuführen, wodurch der Bacillus subtilis große Mengen des thermostabilen Alpha-Amylase-Enzyms erzeugen kann.

Insbesondere wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Herstellung eines chimärischen Plasmids vermittelt, wobei dieses Plasmid ein Gen enthält, das eine hitzebeständige Alpha-Amylase codiert. Das Verfahren besteht zunächst aus dem Zerschneiden jener natürlich vorkommenden Plasmid-DNS, die ein die hitzebeständige Alpha-Amylase codierendes Gen enthält, um auf diese Weise eine lineare DNS-Sequenz zu gewinnen, welche das die Alpha-Amylase codierende Gen enthält. Desgleichen wird ein Vektor zerschnitten, um eine zweite lineare DNS-Sequenz zu erlangen. Schließlich werden die beiden linearen DNS-Sequenzen unter Bildung des chimärischen Plasmids miteinander verknüpft.

Ebenso offengelegt wird das chimärische Plasmid, welches unter Verwendung eines als Donator dienenden natürlich vorkommenden Plasmids gewonnen wurde, wobei dieses Plasmid ein Gen enthält, welches eine hitzebeständige Alpha-Amylase codiert. Das chimärische Plasmid wird durch Zerschneiden der Donator-DNS und Kombinieren der so erhaltenen DNS-Fragmente mit einem in ähnlicher Weise zerschnittenen Vektor hergestellt.

236740 8

-5-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Schließlich wird in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von einer hitzebeständigen Alpha-Amylase in hohen Ausbeuten vermittelt. Mindestens ein das Alpha-Amylase-Gen enthaltendes chimärisches Plasmid wird in einen Wirts-Mikroorganismus eingeführt. Der das chimärische Plasmid enthaltende Mikroorganismus wird in einem geeigneten Medium kultiviert. Daran anschließend wird die vom kultivierten Mikroorganismus produzierte Alpha-Amylase isoliert.

Die vorliegende Erfindung vermittelt ein Verfahren, welches es ermöglicht, in einer einzelnen Zelle zahlreiche Kopien des die hitzebeständige Alpha-Amylase codierenden Gens zu erzeugen. Sie vermittelt desweiteren einen Weg zur Überführung des Amylase-Gens in Mikroorganismen, welche in einfacherer Weise als der Donator-Mikroorganismus angebaut werden können. Somit werden ohne Schwierigkeiten gesteigerte Enzymbausbeuten erzielt.

Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung gelten die folgenden Begriffsbestimmungen:

1. Natürlich vorkommendes Plasmid

Der Begriff "natürlich vorkommendes Plasmid", wie er in der vorliegenden Beschreibung verwendet wird, bezieht sich auf jegliche Plasmid-DNS, die in einem in der Natur vorkommenden Mikroorganismus vorhanden ist.

2. Chimärisches Plasmid

Der Begriff "chimärisches Plasmid" bezieht sich entsprechend dem in der Fachwelt allgemein üblichen Gebrauch auf ein Plasmid aus rekombinanter DNS, welches durch eine bestimmte

236740 8

-6-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Technik der künstlichen genetischen Modifikation aus einem Donator-Mikroorganismus und einem geeigneten Vektorplasmid gebildet wurde.

### 3. Hitzebeständige Alpha-Amylase

Der Begriff "hitzebeständige Alpha-Amylase", wie er in der vorliegenden Beschreibung verwendet wird, bezieht sich auf jedwede Alpha-Amylase-Zubereitung, die in der Lage ist, 45 min lang bei 90 °C, einem pH-Wert von 6,0 und unter Anwesenheit von Calciumionen zumindest 60 % ihrer anfänglichen Aktivität beizubehalten.

### 4. Alpha-Amylase-Gen

Ein DNS-Segment, welches die innerhalb der Zelle erfolgende Alpha-Amylaseproduktion codiert und die für die Synthese einer katalytisch aktiven Alpha-Amylase notwendige regulatorische Information beinhaltet.

Die chimärischen Plasmiden der vorliegenden Erfindung werden unter Verwendung der von einem natürlich vorkommenden Donatororganismus stammenden DNS hergestellt, wobei dieser Donator-Mikroorganismus ein Gen enthält, welches ein hitzebeständiges Alpha-Amylase-Enzym codiert. Geeignete Donatororganismen werden bei jenen wärmeliebenden Bakterien gefunden, die als Bacillus stearothermophilus (abgekürzt B. stearothermophilus) und Thermus flavus (abgekürzt T. flavus) klassifiziert sind. Auch Stämme von Bacillus licheniformis (abgekürzt B. licheniformis) sind geeignete Donator-Mikroorganismen. Als Donator-DNS-Quelle besonders geeignete Stämme von B. stearothermophilus sind jene Stämme, die der B. stearothermophilus-Gruppe der ATCC-Nummern 31 195, 31 196, 31 197, 31 198, 31 199 und 31 783 sowie deren Varianten und

236740 8

-7-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Mutanten wie auch der Submutanten jener Mutanten angehören.

Es ist herausgefunden worden, daß in einer Reihe dieser Mikroorganismen Plasmide vorhanden sind, die ein Gen besitzen, welches ein hitzebeständiges Alpha-Amylase-Enzym codiert.

Plasmid-DNS ist in besonderem Maße als Quelle für die Donator-DNS geeignet, weil sie mit Hilfe einer Ultrazentrifuge leicht gereinigt werden kann. Damit wird eine DNS-Quelle für das Verfahren gewonnen, bei dem die Amylase-Gene hochkonzentriert und frei von vielfältigem fremden und unerwünschten genetischen Material sind.

Um die chimärischen Plasmide der vorliegenden Erfindung zu bilden, ist es möglich, jedweden mit dem Wirts-Mikroorganismus verträglichen Vektor zu verwenden. Diese Plasmide sind vorteilhafter nachzuweisen, wenn der Vektor einen Marker beinhaltet. Insbesondere brauchbar sind jene Vektoren, die einen antibiotikaresistenten Marker enthalten. Plasmide von Escherichia coli, im folgenden als E. coli abgekürzt, die solche antibiotikaresistenten Marker enthalten, sind leicht zugänglich. Als geeignet gelten die mit pBR 322, pBR 325 und pWL 625 bezeichneten Plasmide. Plasmide von Bacillus subtilis, im folgenden als B. subtilis abgekürzt, wie etwa das Plasmid pC 194, welches ein Chloramphenikolresistenz übertragendes Gen enthält, sind ebenfalls geeignet.

Ein Vorteil der Verwendung derartiger Vektoren besteht in der Tatsache, daß sie als Vielzahl von Kopien in einer Zelle existieren können. Wird also ein Alpha-Amylase codierendes Gen in diese Vektoren eingeführt, dann ist das Gen innerhalb der Zellen gleichfalls in vielfachen Kopien vorhanden. Dies resultiert in einer gesteigerten Alpha-Amylase-Produktion

236740 8

-8-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

pro Zelle. Werden E.-coli-Stämme als Wirtsorganismus verwendet, dann ist eine weitere Genverstärkung möglich. Dies erfolgt unter Anwendung der Chloramphenikol-Genverstärkungstechnik nach D.B. Clewell, J. Bacteriology, 110, 667...676 (1972).

Die chimärischen Plasmide der vorliegenden Erfindung werden zunächst dadurch aufgebaut, daß jene natürlich vorkommende DNS, die ein das hitzebeständige Alpha-Amylase-Enzym codierendes Gen enthält, unter Verwendung einer geeigneten Restriktions-Endonuklease zerschnitten wird. Bei der durch die Endonuklease zerschnittenen Donator-DNS handelt es sich vorzugsweise um Plasmid-DNS. Dieses Plasmid kann entweder vor oder nach seiner Abtrennung von der chromosomalen DNS des Donators zerschnitten werden. Die Endonuklease muß von der Art sein, daß sie die Donator-DNS zerschneidet, ohne dabei das Gen zu beschädigen, welches das Alpha-Amylase-Enzym codiert. Als für diesen Zweck geeignete Endonuklease hat sich hier das Enzym Hind III erwiesen.

Der Vektor kann jedoch auch mit jeder anderen Endonuklease zerschnitten werden, welche lineare DNS mit solchen Enden erbringt, die in der Lage sind, sich mit den Enden der Fragmente der Donator-DNS zu verbinden.

Das Zerschneiden kann auf einem Gemisch von Donator-DNS und Vektor erfolgen, die Donator-DNS und der Vektor können aber auch separat zerschnitten werden. In jedem Fall wird ein Gemisch aus linearen DNS-Sequenzen gewonnen. Einige der vom Donator-Mikroorganismus stammenden linearen Sequenzen enthalten das die Alpha-Amylase codierende Gen.

Die durch Zerschneiden von Donator-DNS und Vektor gewonnenen

236740 8

-9-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

linearen DNS-Sequenzen werden vermischt und verbinden sich miteinander unter Bildung eines neuen Plasmids, des chimärischen Plasmids. Das Verbinden der linearen DNS-Sequenzen erfolgt mittels einer Ligase unter Anwendung der im Fachgebiet weithin bekannten Techniken. Eine für diesen Zweck brauchbare Ligase ist die im Fachhandel erhältliche T<sub>4</sub> DNS-Ligase.

Die chimärischen Plasmide der vorliegenden Erfindung werden biologisch aktiv gemacht, indem sie in Wirtszellen eines geeigneten Mikroorganismus überführt werden. Zu den geeigneten Wirten gehören die amylasen negativen E.-coli-Stämme RRL und C600, die amylasen negativen B.-subtilis-Stämme ATCC Nr. 31 785 und Bacillus Genetic Stock Center Nr. 1A289. Die Überführung erfolgt unter Anwendung weithin bekannter Methoden. Diese Methoden beinhalten die Absorption von Plasmiden durch zuständige Zellen, die Protoplastfusion sowie die Absorption durch E.-coli-Zellen, welche mit CaCl<sub>2</sub> behandelt worden sind.

Die Zellen, welche die gewünschten Plasmide enthalten, werden durch Screening der Zellen mit der Amylaseaktivität des Donators ausgelesen. Enthält der Vektor einen antibiotikaresistenten Marker, dann erfolgt vorteilhafterweise ein vorangehendes Screening durch Plattieren der Zellen auf Agarplatten, die das Antibiotikum im Medium enthalten. Nur jene Zellen, welche die gewünschte Resistenz aufweisen, werden sodann angebaut. Die Amylaseaktivität wird ermittelt, indem den Platten lösliche Stärke zugesetzt wird. Nach dem Wachstum werden die Platten mit einer verdünnten Iodlösung behandelt oder Ioddampf ausgesetzt. Nur jene Kolonien, welche die gewünschte Amylaseaktivität besitzen, werden helle Flächen zeigen, auf denen die Stärke abgebaut worden ist und infolge-

236740 8

-10-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

dessen keine Färbung mit dem Iod möglich ist.

Wenn die die rekombinaten Plasmide enthaltenden Zellen die Alpha-Amylase intrazellulär produzieren, dann ist es erforderlich, die Zellen zu lysieren, bevor es möglich ist, das Enzym nachzuweisen. E.-coli-Zellen werden geeigneterweise mit dem Bakteriophagen T<sub>4</sub> oder mit D-Zykloserin lysiert.

Es hat sich gezeigt, daß bei Verwendung von B.subtilis-Stämmen als Wirt für die chimärischen Plasmiden die von den Zellen erzeugte Alpha-Amylase-Enzym von den Zellen in das Medium exportiert wird. Dieser Befund ist für die industrielle Herstellung des Enzyms von Wichtigkeit, da hierbei der aufwendige Schritt der Zell-Lysierung vermieden wird. Das B. subtilis ist darüber hinaus ein besonders wünschenswerter Wirt insofern, als es eine an industrielle Vergärungen gut angepaßte Art darstellt.

Chimärische Plasmide, die von den Wirtszellen erzeugt worden sind, lassen sich unter Anwendung bekannter Verfahren ohne weiteres isolieren. Eines dieser Verfahren ist das Standard-Reinlysat-Verfahren nach Clewell und Helinski, Biochemistry, 9, 4428 ... 4440 (1970). Die Reinigung der Plasmide kann vermittels der CsCl-Dichtegradient-Ultrazentrifugation erfolgen.

Die das Alpha-Amylase-Gen enthaltenden chimärischen Plasmide können als ein Donator für diese Gene verwendet werden. Die Plasmide werden mit einer hierfür geeigneten Restriktions-Endonuklease zerschnitten, um lineare DNS zu ergeben, welche das Alpha-Amylase-Gen enthält. Die lineare DNS kann mittels Saccharose-Gradient-Ultrazentrifugation gereinigt werden. Dieses genetische Material wird dann mit einem anderen Vek-

236740 8

-11-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

tor kombiniert, um ein differentes chimärisches Plasmid zu ergeben.

Die Alpha-Amylase, die von den das chimärische Plasmid enthaltenden Wirtszellen erzeugt wird, behält ihre hitzebeständigen Eigenschaften bei. Dies trifft selbst dann zu, wenn es sich bei dem Wirts-Mikroorganismus um einen Mesophilen handelt, also dieser selbst kein Thermophiler ist. Desweiteren scheinen die Produkte, die durch die Wirkung der von dem geklonten Mikroorganismus stammenden Amylase auf Stärke erzeugt werden, mit jenen Produkten identisch zu sein, die durch die Amylase des Donator-Mikroorganismus erzeugt wurden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dazu verwendet werden, zwei oder mehrere unterschiedliche chimärische Plasmide, welche hitzebeständige Alpha-Amylase codierende Gene enthalten, in den gleichen Wirts-Mikroorganismus zu überführen. So wurde beispielsweise E. coli RRI durch die Einlagerung jener chimärischen Plasmide modifiziert, die durch Kombinieren eines hitzebeständigen Alpha-Amylase-Gens mit den Vektoren pBR 325 und pWL 625 gewonnen wurden. Beide Plasmide wurden inkorporiert, verdoppelt und durch die Wirtszellen dargestellt.

#### Ausführungsbeispiel

Die folgenden Ausführungsbeispiele illustrieren bestimmte Verkörperungen der vorliegenden Erfindung. Sofern nicht anders angegeben, beruhen sämtliche Verhältnis- und Prozentangaben auf der Massebasis.

Alle ATCC-Nummern tragenden Stämme sind bei der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, erhältlich.

236740 8

-12-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Ausführungsbeispiel 1

Herstellung von Plasmiden, die Alpha-Amylase-Gene und einen Antibiotika-Resistenzmarker enthalten.

Unter Anwendung der allgemeinen Methode von Berns und Thomas, J. Molec. Biol., 11, 476...490 (1965), wurde aus Zellen eines Stammes von B. stearothermophilus, ATCC-Nr. 31 783, die gesamte Alpha-Amylase-Gene enthaltende DNS isoliert. Im vorliegenden Verfahren indes nicht in Standard-Salzzitrat, sondern in einer Mischung aus 50 mM tris(Hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (im folgenden als Tris-HCl beschrieben) bei pH 8, 0,6 mM Ethylendiamintetraessigsäure (im folgenden als EDTA bezeichnet) und 25 % Saccharose suspendiert. Die Zellen wurden darüber hinaus eine Stunde lang vor der Lysis bei 0 °C mit Lysozym (2 mg/ml) behandelt. Die Plasmid-pBR-322-DNS, das Restriktionsenzym Hind III und die T<sub>4</sub>-DNS-Ligase wurden von den Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Maryland, bezogen.

Ein Gemisch aus 7,5 µg Gesamt-DNS von B. stearothermophilus, 7 Einheiten (E) Restriktionsenzym Hind III und 10 µg bovinem Serumalbumin in einer 100-µl-Lösung aus 50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 6 mM MgCl<sub>2</sub> wurde bei 37 °C 30 min lang inkubiert. 2,2 µg Plasmid-pBR322-DNS und 7 E Hind III wurden in 20 µl einer ähnlichen Lösung eine Stunde lang bei 37 °C verdaut. Die DNS-Analyse auf Agarose-Gel zeigte, daß die Verdauung vollständig war.

Nun wurden 6,75 µg der verdauten B.-stearothermophilus-DNS 1,8 µg der verdauten pBR322-DNS in 0,3 ml einer Lösung aus 66 mM Tris-HCl (pH 7,6), 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol und 0,067 mM Adenosintriphosphat (im folgenden ATP genannt)

236740 8

-13-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

vermischt und unter Verwendung von 0,28 Einheiten  $T_4$ -DNS-Ligase miteinander verknüpft. Eine Analyse der DNS nach der Ligation auf Agarose-Gelen zeigte, daß es zu einer vollständigen Ligation ohne nachweisbare Reste von linearer pBR 322-DNS gekommen war.

### Ausführungsbeispiel 2

Transformation von Plasmiden, die Alpha-Amylase-Gene und einen Antibiotika-Resistenzmarker enthalten, in E. coli

Eine Kultur von E. coli RRI, als Stamm PRC 399 beim Plasmid Reference Center, Stanford University Medical Center, Stanford, California, erhältlich, wurde auf dem nachstehenden Medium angebaut:

	<u>g/Liter</u>
Trypton	10,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Glukose	1,0

Die Kultur wurde bei 37 °C über Nacht in einem Reagenzglas angebaut. Sie wurde dann mit 9 Teilen des gleichen Mediums verdünnt und bei 37 °C für weitere 135 min unter kräftigem Ver-rühren inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ge-erntet und mit kalter 0,1 M NaCl-Lösung gewaschen. Die ge-ernteten E.-coli-Zellen wurden für die Transformation mit Hilfe der Calciumchloridmethode nach Cohen et al., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 69, 2110...2114 (1972) präpariert.

Eine Hälfte der in Ausführungsbeispiel 1 hergestellten verknüpften DNS wurde in die Zellen von E.coli RRI transformiert.

236740 8

-14-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Die Zellen wurden auf Platten kultiviert, die das gleiche Medium enthielten, auf dem auch die E.-coli-Zellen angebaut worden waren, mit Ausnahme dessen, daß hier das Medium Ampizillin in einer Konzentration von 50 µg/ml enthielt. Auf diese Weise wurden nur solche Zellen von E. coli gewonnen, die das Plasmid pBR322 (mit ampizillinresistenten Genen) enthielten.

Als Hilfsmittel zur Bestimmung der Anzahl von Zellen, die rekombinante DNS enthielten, wurden die ampizillinresistenten Zellen hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Tetrazyklin kontrolliert. Da die Insertion eines DNS-Stückes in die durch Hind III zerschnittene Stelle von pBR322 das für Tetrazyklin-Resistenz zuständige Plasmid-Gen gewöhnlich inaktiviert, ergibt sich die Anzahl der in der Zellpopulation vorhandenen rekombinanten DNS-haltigen Zellen aus der Häufigkeit der Tetrazyklin-Sensitivität. Die Transformation erbrachte  $3,6 \times 10^4$  ampizillin-resistente Zellen pro Milliliter sowie  $3,0 \times 10^4$  tetrazyklin-resistente Zellen pro Milliliter. Folglich waren etwa 16 % der Zellen gegenüber Tetrazyklin sensitiv, woraus hervorgeht, daß die Plasmide aufweisen, welche rekombinante DNS enthalten.

### Ausführungsbeispiel 3

Isolation von Alpha-Amylase produzierenden E.-coli-Kolonien. Zubereitet wurde ein Medium der gleichen Zusammensetzung wie jenes, das für den Anbau von E. coli verwendet worden war, wobei allerdings noch 15 g/Liter Agar plus Ampizillin (50 µg/ml) zugesetzt wurden. Dieses Medium wurde in 130 Petrischalen eingebracht und mit verdünnten transformierten E. coli inokuliert, die in der in Ausführungsbeispiel 2 dargestellten Weise präpariert worden waren. Diese Schalen erbrachten eine Ausbeute von durchschnittlich 113 Kolonien pro

236740 8

-15-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Schale. Die Kolonien durften bis zu einer Größe von etwa 1...2 mm Durchmesser wachsen, bevor sie auf ein Stärke-medium der folgenden Zusammensetzung gebracht wurden:

	<u>g/Liter</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1
Hefeextrakt	1
Pepton	10
Agar	15
Lintner's Stärke	10

Nach dreistündigem Wachstum wird der Bakteriophage T<sub>4</sub> - als ATCC-Nr. 11303-B4 erhältlich - den Schalen in einer stärkehaltigen Überschichtung zugesetzt. Um die wachsenden E. coli zu lysieren, werden etwa  $1 \times 10^7$  T<sub>4</sub> pro Schale verwendet; auf diese Weise werden etwaige intrazelluläre Enzyme freigesetzt. Nach Wachstum und Lysis über Nacht wurde eine 2,5 %ige Lösung von Lugol's Iodlösung auf die Schalen geschüttet, um irgendwelche durch Amylaseaktivität erzeugte helle Zonen nachzuweisen.

Von den ungefähr 15 000 vorhandenen Kolonien erzeugten 18 Kolonien helle Zonen, dergestalt auf die Anwesenheit von Amylase hinweisend. Die Amylaseaktivität enthaltenden Kolonien wurden abdruckplattiert und erwiesen sich erneut als amyloseaktivitätshaltig. Die Amylaseaktivität zeigte sich allerdings lediglich nach dem Zusetzen von T<sub>4</sub> zur Zell-Lysis, woraus hervorgeht, daß die Amylase intrazellulär erzeugt wurde. Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich, daß für das Lysieren der Zellen D-Zykloserin die gleiche Wirksamkeit wie

236740 8

-16-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

T<sub>4</sub> besitzt, wenn die Droge dem Überschichtmedium in einer Konzentration von 600 µg/ml zugesetzt wurde.

Ein E.-coli-RRI-Stamm, der den Plasmidvektor pBR322 mit einem Amylasegen enthält, ist als ATCC-Nr. 31 789 erhältlich.

#### Ausführungsbeispiel 4

Transformation von Plasmiden, die Alpha-Amylase-Gene und einen Antibiotikaresistenz-Marker enthalten, in einen zweiten Stamm von E. coli.

Eine Kultur E. coli C600 der ATCC-Nr. 23 724 wurde angebaut, die Zellen wurden geerntet und entsprechend der Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 2 für die Transformation vorbereitet.

Fünf in Ausführungsbeispiel 3 gewonnene unterschiedliche Amylaseklone wurden angebaut, und die rekombinanten Plasmide wurden unter Anwendung der Standard-Reinlysat-Methode nach Clewell und Helinski, Biochemistry, 9, 4428...4440 (1970) extrahiert. Die teilweise gereinigte Plasmid-DNS wurde vor der Transformation in die CaCl<sub>2</sub>-behandelten E.-coli-Zellen in einer Mischung aus 10mM Tris-HCl und 1,0 mM EDTA bei pH 7,5 suspendiert. Diese DNS wurde analysiert und erwies sich als steril, so daß also keine Amylaseproduzierenden Kolonien vorliegen dürften, deren Existenz auf die Darstellung von Zellen, die mit der DNS eingeführt wurden, zurückzuführen wäre. Die transformierten Zellen wurden auf Ampizillinhaltigem Medium angebaut, um das Wachstum lediglich jener Zellen zu gestatten, die Plasmide enthalten. Bei der Kontrolle der Kolonien hinsichtlich Amylaseaktivität zeigte sich eine 100%ige Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Plasmiden und Amylaseaktivität. Somit erweist sich Plasmid-DNS ein-

236740 8

-17-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

deutig in der Lage, beide E. coli Stämme zu transformieren, um Amylaseerzeuger zu ergeben; damit zeigt sich, daß das Phänomen nicht stammabhängig ist, daß es jedoch hierzu des rekombinanten Plasmids bedarf.

Ein Stamm von E. coli C600, der den Plasmidvektor pBR322 mit einem Amylasegen enthält, ist unter der ATCC-Nr. 31 788 erhältlich.

#### Ausführungsbeispiel 5

Hitzebeständigkeit der Alpha-Amylase.

Unter Verwendung des Kulturmediums aus Ausführungsbeispiel 2 wurden vier in Ausführungsbeispiel 3 gewonnene Amylaseklone und eine E.-coli-RR1-Kontrollkultur in 15-ml-Kulturen angebaut.

Die Zellen wurden durch Zusetzen von D-Zykloserin lysiert, daran anschließend wurden die Zellbruchstücke durch Zentrifugation entfernt. Den überstehenden Flüssigkeiten wurde Natriumazetat und Calciumchlorid zugesetzt, um eine Konzentration von 50 mM bzw. 2,5 mM zu ergeben, der pH-Wert wurde auf 6,0 eingestellt. Die Enzymlösungen wurden in mit Schraubverschluß versehene und mit Teflonband ausgekleidete Reagenzröhrchen eingebracht. Die Lösungen wurden vor und nach einem 45 minütigen Erhitzen auf 90 °C hinsichtlich ihrer Amylaseaktivität untersucht. Die Amylaseaktivität wurde durch die Geschwindigkeit der Stärkehydrolyse bestimmt, die sich ihrerseits in der Geschwindigkeit der Abnahme der Iod-Färbekapazität widerspiegelte; die Messung erfolgte spektrofotometrisch in Übereinstimmung mit der allgemeinen Methode nach B.W. Smith und J.H. Rowe, J. Biol. Chm., 179, 53 (1949). Das Kontroll-E.- coli zeigte keine Amylase-

236740 8

-18-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

aktivität. Gereinigte Amylasen von B. stearothermophilus, ATCC-Nr. 31 783, B. subtilis (erhältlich von der Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri unter der Bezeichnung Sigma A6380<sup>1)</sup>) und Termamyl (eine hitzebeständige Alpha-Amylase (erhältlich bei der Fa. Novo Laboratories, Inc., Wilton, Conn.) wurden dem Kontroll-E. coli-Lysat zugesetzt, um als Standards für die Hitzebeständigkeit zu dienen. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle I dargestellt.

---

1)

Wenn auch der Katalog der Fa. Sigma Chemical Company dieses Enzym als eine Alpha-Amylase von B. subtilis führt, so haben doch H. Chung und F. Freiberg, Biochem. J., 185, 387...395 (1980) den Nachweis erbracht, daß es sich hierbei um ein Enzym von Bacillus amyloliquefaciens handelt.

236740 8

-19-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Tabelle I  
werte der Hitzebeständigkeit

Quelle des Zell-Lysats	anfangs- aktivität, E/ml	Aktivität nach 45 min., 90 °C E/ml	% Ver- blei- bende Aktivi- tät
E. coli RR1 (Kontrolle)	0	0	--
Kontrolle + <u>B. stearothermophilus</u> Alpha-Amylase (von ATCC 31783)	0,21	0,15	71,4
Kontrolle + Termamyl	0,39	0,34	87,2
Kontrolle + <u>B. subtilis</u> Alpha-Amylase (sigma A6380)	0,21	0,01	4,8
Kontrolle + Klon 1	0,45	0,38	84,4
Kontrolle + Klon 2	0,22	0,18	81,8
Kontrolle + Klon 3	0,36	0,29	81,0
Kontrolle + Klon 4	0,42	0,35	83,3

Die durch die Klone erzeugte Amylase erweist sich als mindestens genauso hitzebeständig als das durch den Donator B. stearothermophilus produzierte Enzym. Sie ist hinsichtlich der Hitzebeständigkeit der handels erhältlichen hitzebeständigen Alpha-Amylase, Termamyl, vergleichbar, und sie übertrifft die Alpha-Amylase von einem kommerziellen B. subtilis in bezug auf die Hitzebeständigkeit in eindeutiger Weise.

Um die erzeugten Zucker, welche niedrige relative Molekülmas-  
sen aufwiesen, mittels der Dünnschichtchromatografie iden-  
tifizieren zu können, wurden Hydrolysate gewonnen, indem  
Stärke mit jeder der Amylasen verdaut wurde. Die relativen  
Mengen der durch die Amylasen von E.-coli-Klonen gebildeten  
Zucker niedriger relativer Molekülmassen ähnelten den Mengen  
jener Zucker, die durch die als Kontrollvarianten benutzten

236740 8

-20-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

bekannten Alpha-Amylasen gebildet worden waren.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das von einem extrem thermophilen Bakterium gewonnene Gen für ein hitzebeständiges Enzym in zuverlässiger Weise in einem mesophilen bakteriellen Wirt ausgedrückt worden ist, um ein hitzebeständiges Enzymprodukt zu erbringen. Auf diese Weise hat sich herausgestellt, daß unter Anwendung rekombinanter DNS-Methoden ein Gen aus einem in hohem Maße thermophilen Bakterium in einem mesophilen Bakterium ausgedrückt werden kann. Darüber hinaus kommt die Synthese des aktiven hitzebeständigen Enzyms bei normalen mesophilen Temperaturen (ungefähr 20...40 °C) zustande.

#### Ausführungsbeispiel 6

Isolation von natürlich vorkommenden Plasmiden, die Alpha-Amylase-Gene enthalten.

Unter Anwendung der in Ausführungsbeispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise wurde die gesamte DNS von den Zellen von B. stearo-thermophilus der ATCC-Nr. 31 783 isoliert. Die Plasmid-DNS wurde von der Gesamt-DNS vermittelt CsCl-Ethidiumbromid-Ultrazentrifugation nach der Methode von R. Radloff, W. Bauer und J. Vinograd, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 57, 1514... 1521 (1967) separiert. Durch die nachstehende Vorgehensweise wurde gezeigt, daß diese Plasmid-DNS ein Alpha-Amylase-Gen enthält.

Wie in Ausführungsbeispiel 1 wurde die Plasmid-DNS unter Einsatz des Restriktionsenzym Hind III zerschnitten. Durch Einführen dieser DNS in E. coli (entsprechend den Ausführungsbeispielen 1...3) wurden Klone gebildet. Die Analyse des tetrazyklinresistenten Phänotyps zeigte, daß 3,3 % der Zellen tetrazyklin-sensitiv waren und demzufolge geklonte DNS

236740 8

-21-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/3

60 256/18

enthielten. Das Screening nach Zellen mit Alpha-Amylase-aktivität zeigte, daß 0,42 % oder etwa 1 von jeweils 8 geklonte DNS enthaltenden Zellen das Amylase-Gen aufwies. Das Zerschneiden der B.-stearothermophilus-Plasmide mit Hind III erbringt lineare DNS-Stücke, die sich bei Elektrophorese auf Agarose-Gel in 8 leicht nachweisbare Banden aufteilen. Die Häufigkeit des Klonens des Amylasestückes (1/8) entspricht etwa dem Erwartungswert, da eine der 8 vorherrschenden Banden das Amylase-Gen aufwies. Darüber hinaus zeigt die Analyse dieser Plasmid-Banden, daß eine der Banden etwa 3,6 Md ist; die gleiche Größe wies jenes geklonte DNS-Stück auf, das bei der Analyse der Plasmide aus Ausführungsbeispiel 1 gewonnen wurde.

Dieses Experiment weist eindeutig darauf hin, daß mindestens ein Alpha-Amylase-Gen auf einem natürlich vorkommenden Plasmid in dem verwendeten Stamm von B.stearothermophilus lokalisiert ist.

#### Ausführungsbeispiel 7

Präparation und Isolation von E.-coli-Stämmen, die unterschiedliche chimärische Plasmide enthalten.

A. Eine Kultur des in Ausführungsbeispiel 3 isolierten amy-lase-produzierenden E.coli - ATCC-Nr. 31 789 - wurde über Nacht in dem in Ausführungsbeispiel 2 verwendeten Medium angebaut. Die Plasmid-DNS wurde vermittels der Methode nach Clewell, D.B., J. Bacteriology, 110, 667...676 (1972) verstärkt, wobei 170 µg Chloramphenikol pro ml verwendet wurden. Für die Verstärkung wurde das nachstehende Medium benutzt:

236740 8

-22-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

	<u>g/Liter</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
NaCl	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
Kasein-Aminosäuren	5,0
Glukose	2,0
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,015
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,246
Vitamin B <sub>1</sub>	0,001

Die Plasmid-DNS wurde sodann unter Anwendung der Standard-Reinlysat-Methode nach Clewell und Helinski, Biochemistry 9, 4428...4440 (1970) isoliert. Die isolierten Plasmide wurden vermittels der CsCl-Ethidiumbromid-Methode aus Ausführungsbeispiel 6 und daran anschließend durch Extraktion mit Isopropanol und ausgedehnte Dialyse in 10mM Tris plus 1 mM EDTA bei pH 7,5 gereinigt.

Eine Kultur von E.coli RR1, PRC 399, welches das 3,9 Md Plasmid pBR325 enthält, wurde angebaut, und die Plasmid-DNS wurde vermittels der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Vorgehensweisen verstärkt, isoliert und gereinigt.

Plasmid-DNS der beiden Quellen wurde mit Restriktionsenzym Hind III zerschnitten. Lösungen der zerschnittenen Plasmide wurden vermischt und durch die allgemeine Methode nach Ausführungsbeispiel 1 bei 0 °C über 18 h hinweg miteinander verknüpft.

236740 8

-23-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Die verknüpfte DNS wurde vermittels der in Ausführungsbeispiel 2 beschriebenen Methode in E. coli RRL transformiert. Die Zellen wurden verdünnt und auf Agarplatten plattiert, welche Chloramphenikol in einer Konzentration von 25 µg/ml enthielten. Auf diese Weise wurden nur solche Zellen von E. coli gewonnen, die das Plasmid pBR325 (mit chloramphenikolresistenten Genen) enthielten. Kolonien auftauchender Zellen wurden einem Screening hinsichtlich ihrer Amylaseaktivität unterzogen, hierzu wurde die in Ausführungsbeispiel 3 beschriebene Methode unter Einsatz von D-Zykloserin zum Lysieren der Zellen angewendet.

Die rekombinante Plasmid-DNS von drei Kolonien, welche Amylaseaktivität zeigten und chloramphenikolresistent waren, wurde vermittels des Rein-Lysat-Verfahrens aus Ausführungsbeispiel 4 extrahiert. Die Separation der rekombinanten Plasmide auf Agaose-Gelen zeigte, daß diese die richtige Größe für eine Kombination von Plasmid pBR325 plus ein das Amylase-Gen enthaltendes 3,6-Md-Fragment hatten. Die Verdauung des Plasmids mit Hind III Enzym ergab ein 3,6-Md-Fragment und die lineare Form von pBR325. Dieses Beispiel zeigt, daß das Amylase-Gen auf einem unterschiedlichen Vektor - pBR325 - einer Reklonung unterzogen werden kann, ohne dabei seine amyraseerzeugende Aktivität zu verlieren. Der resultierende E.-coli-Stamm ist als ATCC-Nr. 31792 erhältlich.

B. Das in Teil A hergestellte chloramphenikol- und ampizillinresistente chimärische Plasmid wurde als Donator jenes DNS-Fragmentes verwendet, welches das Alpha-Amylase-Gen enthält. Dieses Fragment wurde unter Anwendung der allgemeinen Vorgehensweise von Teil A mit dem 10-Md-Vektorplasmid pWL625 kombiniert. Das Plasmid pWL625 wurde von W.Goebel et al., Molec. Gen. Genet., 157, 119...129 (1977) beschrieben. Es

236740 8

-24-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

kann vermittels der in Teil A dieses Ausführungsbeispiels angewendeten Plasmid-Isolationsmethode aus einer Kultur eines Stammes von E. coli der ATCC-Nr. 31 737 isoliert werden. Dieser Vektor überträgt die Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampizillin und Kanamycin. Die Insertion von DNS in pWL625 an der Hind-III-Stelle zerstört die Kanamycin-Resistenz.

Zellen von E. coli RR1, welche mit der rekombinanten DNS transformiert worden waren, wurden auf ampizillinhaltigen Agarplatten angebaut. Für die Analyse wurden jene Kolonien ausgelesen, die gegenüber Ampizillin resistenz waren, infolge von pBR325 nicht resistent gegenüber Chloramphenikol waren und Amylaseaktivität zeigten. Von den Kolonien wurde Plasmid-DNS isoliert. Die Analyse auf Agarose-Gelen vor und nach der Verdauung mit Hind-III-Enzym zeigte, daß jenes DNS-Fragment, welches das Amylase-Genenthält, unter Hervorbringung eines neuen Plasmid auf dem pWL625-Plasmid geklont wurde. Der dieses chimärische Plasmid enthaltende E.-coli-Stamm ist als ATCC-Nr. 31 791 erhältlich.

#### Ausführungsbeispiel 8

Transformation zweier differenter chimärischer Plasmide in einen Stamm von E. coli.

Der in Ausführungsbeispiel 7B hergestellte amyraseerzeugende E.-coli-Stamm wurde angebaut und gemäß Vorgehensweise nach Ausführungsbeispiel 2 zur Transformation vorbereitet. Das in Ausführungsbeispiel 7A hergestellte gereinigte Plasmid wurde in diese Zellen transformiert. Wurden die resultierenden Zellen auf chloramphenikolhaltigen Agarplatten angebaut, so zeigten sämtliche Kolonien Amylaseaktivität. Von einer der Kolonien wurde Plasmid-DNS isoliert und auf Agarose-

236740 8

-25-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Gelen analysiert. Es zeigte sich, daß sowohl das in Ausführungsbeispiel 7A als auch das in Ausführungsbeispiel 7B beschriebene chimärische Plasmid vorhanden war. Dieses Experiment zeigt, daß E. coli gleichzeitig zwei unterschiedliche Alpha-Amylase-Gene enthaltende chimärische Plasmide zum Wachstum bringen und erhalten kann. Die Langzeitstabilität dieser Kombination von Plasmiden ist nicht ermittelt worden. Der diese zwei chimärischen Plasmide enthaltende E.-coli-Stamm ist als ATCC-Nr. 31 790 erhältlich.

#### Ausführungsbeispiel 9

Transformation von Plasmiden, die Alpha-Amylase-Gene und einen Antibiotika-Resistenzmarker enthalten, in einen Stamm von B. subtilis.

A. Donator-DNS-Herstellung: Als Donator des das Alpha-Amylase-Gen enthaltenden DNS-Fragmentes wurde das in Ausführungsbeispiel 7B erzeugte chimärische Plasmid verwendet. Es wurde nach dem Rein-Lysat-Verfahren nach Clewell und Helinski, Biochemistry, 9, 4428...4440 (1970) extrahiert. Dieses Plasmid-DNS wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III zerschnitten. Das Verdauungsprodukt wurde mit einer kleinen Menge Ethidiumbromid vermischt und unter Anwendung der Saccharose-Gradientmethode nach El-Gewely und Helling, Anal. Biochem., 102, 423...428 (1980) separiert. Das das Alpha-Amylase-Gen enthaltende 3,6-Md-Fragment wurde zweimal mit n-Butylalkohol extrahiert, mit einem gleichen Volumen Isopropylalkohol ausgefällt, bei pH 7,5 in 10 mM Tris plus 1 mM EDTA suspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gehalten.

236740 8

-26-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

B. Vektor-Präparation: Ein vom Bacillus Genetic Stock Center, Dept. of Microbiology, Ohio State University, Columbus, Ohio bezogener und mit der Stamm-Nr. 1817 versehener B. subtilis-Stamm, welcher das 2,0-Md-Plasmid pC194 enthält, welches seinerseits ein die Chloramphenikol-Resistenz übertragendes Gen enthält, wurde streifenweise auf einer Platte angelegt, die tryptischen Soja-Ager (erhältlich von der Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan - im folgenden als Difco abgekürzt) und 50 µg/ml Chloramphenikol enthielt. Sodann wurden die Zellen in 150 ml Penassay-Bouillon (Difco) in einem 1-Liter-Kolben inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angebaut. Die Zellen wurden pelletiert und in 10 ml Protoplast-Puffer (25 % Saccharose, 0,1 M NaCl-0,05 M Tris.HCl bei pH 7,5 und 0,05 M EDTA bei pH 8,13) resuspendiert. Über 30 min hinweg wurden bei 37 °C 5 mg Eiweiß-Lysozym (Sigma Chemical Company) zugesetzt. Sodann wurden 13 ml 2 %iges Natriumdodezylsulfat in 0,7 M NaCl sowie danach 2,4 ml 5M NaCl vorsichtig beigemischt. Die Mischung wurde in Eiswasser abgekühlt und bei 12 100 x g 20 min lang zentrifugiert.

Die DNS wurde mit einem gleichen Volumen Isopropylalkohol ausgefällt. Der Feststoff wurde 60 h lang in Eiswasser aufbewahrt, bevor er mittels Zentrifugation gesammelt und in einer Lösung aus 0,01 M Tris-Hydrochlorid und 0,001 M EDTA bei pH 7,5 suspendiert wurde. Die Abscheidung der Plasmid-DNS erfolgte unter Anwendung der CsCl-Ethidiumbromid-Ultrazentrifugation nach der Methode von Radloff et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 57, 1514...1521 (1967). Das 2-Md-Plasmid wurde durch Extraktion mit Isopropylalkohol und ausgedehnte Dialyse in 10 mM Tris plus 1mM EDTA bei pH 7,5 behandelt.

236740 8

-27-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/S

60 256/18

C. Herstellung des chimärischen Plasmids: Der 2-Md-Vektor aus Teil B wurde mit dem Hind-III-Restriktionsenzym zerschnitten und mit dem 3,6-Md-Fragment aus Teil A vermischt. Die Konzentrationen der Vektor- bzw. Donator-DNS's betragen 6 bzw. 17  $\mu\text{g/ml}$ . Die Ligation erfolgte unter Anwendung des allgemeinen Verfahrens aus Ausführungsbeispiel 1. Das Fehlen jeglichen linearen 3,6-Md-Fragmentes nach der Ligation, das sich mittels Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte, weist darauf hin, daß die Ligation vollständig erfolgt war.

D. Transformation des chimärischen Plasmids in *B. subtilis*: Eine kein Amylase-Gen enthaltende *B. subtilis*-Kultur (ATCC-Nr. 31 785) wurde über Nacht auf einer Platte angebaut, welche Tryptose Blut Agar-Base (Difco) und 1 % lösliche Stärke enthielt. Der Platte wurden 2 ml des nachstehenden Nährmediums zugesetzt:

	<u>Prozent</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6
Natriumzitrat.2 $\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,12
Glukose	0,5
Kaseinaminosäuren(Difco)	0,02
L-Tryptophan	0,005

Etwa 0,1 ml der so gewonnenen Zellsuspension wurden zu 10 ml des gleichen Mediums in einem 250-ml-Kolben hinzugegeben und 4 h lang bei 37 °C unter kräftigem Umrühren inkubiert. Sodann wurde 1 ml der Kultur bei 37 °C zu 9 ml vorgewärmten Transformationsmedium hinzugegeben, worauf die Inkubation unter Schütteln für 90 min fortgesetzt wurde. Das Transformations-

236740 8

-28-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

medium hatte die gleiche Zusammensetzung wie das Wachstumsmedium, außer daß es 0,01 % Kasaminisäuren und 0,0005 % L-Tryptophan enthielt. Zu 0,25 ml Zellsuspension mit einem Gehalt von etwa  $1 \times 10^8$  Zellen/ml wurden 5  $\mu$ l der Lösung des chimärischen Plasmids aus Teil C hinzugegeben, welche 0,12  $\mu$ g des Plasmids enthielt. Das Gemisch wurde 30 min lang bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Sodann wurde die Mischung mit einem gleichen Volumen Penassay-Bouillon (Difco) verdünnt, und das Schütteln wurde bei 37 °C über weitere 90 min hinweg fortgesetzt. Zellen, 0,1 ml Aliquote, wurden auf Platten verteilt, welche Tryptose-Blut-Agarbase (Difco), 1 % lösliche Stärke und 20  $\mu$ g/ml Chloramphenikol enthielten. Zur Kontrolle wurden auf dem gleichen Medium B.-subtilis-Zellen ohne zugesetztes Plasmid sowie B.-subtilis-Zellen mit dem Vektorplasmid pC194 plattiert.

Auf den Platten, auf denen die Zellen kein zugesetztes Plasmid enthielten, waren keine Kolonien zu sehen. Auf den Platten, auf denen die Zellen das Plasmid pC194 enthielten, waren drei Kolonien zu sehen, keine dieser Kolonien indes zeigte Amylaseaktivität.

Eine Kolonien war auf jenen Platten zu beobachten, die mit Zellen versehen waren, welche die DNS des chimärischen Plasmids aus Teil C enthielten. Diese Kolonie ergab bei Iod-dampf-Exposition eine helle Zone, woraus hervorgeht, daß durch diese Zellen extrazelluläres Amylaseenzym erzeugt worden war. Die Zellen scheinen zur Stabilität der Anwesenheit von Chloramphenikol zu bedürfen. Diese Kultur ist unter der ATCC-Nr. 31 786 erhältlich.

236740 8

-29-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/0

60 256/18

Eine Probe der DNS von der amylasehaltigen Kolonie wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese separiert. Dabei wurde ein Plasmid-Band von etwa 5,6 Md beobachtet. Dies entspricht der Größe des chimärischen Plasmids von Teil C.

Das gereinigte chimärische Plasmid wurde mit Hind-III-Restriktionsenzym zerschnitten und einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen. Dabei wurden zwei Fragmente von etwa 2,0 Md und 3,6 Md gewonnen. Diese entsprechen den Größen der Donator-DNS von Teil A und der Vektor-DNS von Teil B.

E. Transformation des chimärischen Plasmids in einen zweiten Stamm von B. subtilis

---

Das das Amylase-Gen enthaltende chimärische Plasmid wurde aus den Zellen der amylaseproduzierenden Kolonie von Teil D mit Hilfe jener Vorgehensweise isoliert, die zur Isolation des pC194-Plasmids in Teil B benutzt worden war. Das isolierte chimärische Plasmid wurde in einen anderen amylasenegativen Stamm von B. subtilis transformiert, der als Stamm Nr. 1A289 vom Bacillus Genetic Stock Center, Dept. of Microbiology, Ohio State University, Columbus, Ohio, erhältlich ist. Die Transformation erfolgte unter Anwendung der Protoplast-Fusionsmethode nach S. Chang und S.N. Cohen, Molec. Gen. Genet., 118, 111...115 (1979). Wurden die Zellen wie in Teil D auf Platten angebaut, dann waren auf den nicht chloramphenikolhaltigen Platten etwa  $1 \times 10^8$  Kolonien/ml zu sehen. Auf den chloramphenikolhaltigen Platten waren etwa  $1 \times 10^3$  Kolonien/ml zu beobachten. Alle dieser Kolonien zeigten im Stärke-Iod-Test das Vorhandensein von Amylase. Dieser amylasehaltige B. subtilis ist unter der ATCC-Nr. 31 784 erhältlich.

236740 8

-30-

21.7.1982

AP C 12 M/236 740/0

60 256/18

Ausführungsbeispiel 10

Hitzebeständigkeit der Alpha-Amylase, die durch das das chimärische Plasmid enthaltende B. subtilis erzeugt wurde.

Das B. subtilis, welches das chimärische Plasmid aus Ausführungsbeispiel 9E - ATCC-Nr. 31 784 - enthält, wurde in einem Liter Medium in einem 2,8-l-Fernbachkolben angebaut, wobei das nachstehende Medium eingesetzt wurde:

	<u>Prozent</u>
Maisstärke	9,0
Maiseinweichflüssigkeit	6,0
Hefe-Autosylat x)	0,35
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,05
Maisöl	1,0
Termamyl	(0,05 E/ml)

x)

Prymex 154, erhältlich bei Amber Laboratories, Juneau, Wisconsin.

Das Medium wurde 30 min lang bei 121 °C im Autoklaven behandelt - dies zerstört die Termamylaktivität - und daran anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Sodann wurden dem Medium vor der Inokulation mit den Zellen 0,01 mg Chloramphenikol pro ml zugesetzt. Die Bouillon wurde zentrifugiert, der Hitzebeständigkeitstest wurde an einer verdünnten

236740 8

-31-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/0

60 256/18

Probe der überstehenden Flüssigkeit vorgenommen, wobei die allgemeine Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 5 angewendet wurde. Zum Vergleich wurde die Hitzebeständigkeit von Amylasen von B. stearothermophilus und B. subtilis wie auch von kommerziellem Termamyl in einem 50 mM Natriumazetat und 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> enthaltenden Medium ebenfalls gemessen. (Dies waren die gleichen Vergleichsamylasen, wie sie auch in Ausführungsbeispiel 5 verwendet wurden). Die Prüfergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II  
Werte der Hitzebeständigkeit

Enzymprobe	Anfangs- aktivität, E/ml	Aktivität nach 45 min, 90 °C, E/ml	% verbleibende Aktivität
<u>B. stearothermophilus</u>	1,81	1,16	64
<u>B. subtilis</u>	1,34	0	0
Termamyl	1,26	0,79	63
Enzym von ATCC-Nr. 31 784	1,58	1,07	68

In diesem Test erweist sich die durch den B.-subtilis-Klon der ATCC-Nr. 31 784 erzeugte Amylase als zumindest ebenso hitzebeständig wie das vom Donator B. stearothermophilus erzeugte Enzym. Es ist hinsichtlich seiner Hitzebeständigkeit der technischen hitzebeständigen Alpha-Amylase - Termamyl - vergleichbar, und es übertrifft eindeutig die Hitzebeständigkeit der Alpha-Amylase von B. subtilis.

236740 8

-32-

21.7.1982

AP C 12 N/236 740/0

60 256/18

Somit wird offenbar, daß erfindungsgemäß ein Verfahren geschaffen worden ist, mit dessen Hilfe es möglich ist, chimärische Plasmide herzustellen, die ein ein hitzebeständiges Alpha-Amylase-Enzym codierendes Gen enthalten, wobei diese Plasmide dazu verwendet werden können, eine hitzebeständige Alpha-Amylase zu erzeugen, die den oben genannten Merkmalen, Zielstellungen und Vorteilen in voll befriedigender Weise entspricht. Da die Erfindung im Zusammenhang mit spezifischen Verkörperungen ihrer selbst beschrieben worden ist, ergibt sich daraus, daß dem Fachmann angesichts der vorangegangenen Beschreibung eine Vielzahl von Alternativen, Modifikationen und Variationen möglich sein werden. Alle diese alternativen Lösungen, Modifikationen und Variationen können einbezogen werden, ohne daß dabei von dem in den nachfolgenden Ansprüchen erhobenen Schutzzumfang und Grundgedanken der Erfindung abgewichen wird.

236740 8 -33-

Berlin, den 4.11.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zum Aufbau eines chimären Plasmids mit einer Genkodierung für eine thermostabile Alpha-Amylase, wobei
  - a) eine Donator DNS zerschnitten wird, um eine lineare DNS-Sequenz zu erhalten, die ein eine Alpha-Amylase kodierendes Gen enthält;
  - b) ein geeigneter Vektor zerschnitten wird, um eine zweite lineare DNS-Sequenz zu gewinnen und
  - c) die linearen DNS-Sequenzen der Schritte (a) und (b) verbunden werden;

gekennzeichnet dadurch, daß die Donator-DNS 1. ein natürlich vorkommendes Plasmid ist, das eine Genkodierung für eine thermostabile Alpha-Amylase enthält oder 2. ein anderes chimärisches Plasmid ist, das ein DNS-Fragment mit einer Genkodierung für eine thermostabile Alpha-Amylase enthält, wobei das DNS-Fragment aus dem natürlich vorkommenden Plasmid gewonnen wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Vektor ein Plasmid ist, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus E. coli-Plasmiden, pBR322, pBR325 und pWL625 und B. subtilis-Plasmid pC194 besteht.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das natürlich vorkommende Plasmid von einem B.stearothermophilus-Stamm abgeleitet wird.

236740 8

34

~~2~~

4.11.1982

AP C 12 N/236 740/8

60 256/18

4. Verfahren nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß der B.stearothermophilus-Stamm aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus B.stearothermophilus, ATCC-Nummern 31, 195; 31, 196; 31, 197; 31, 198; 31, 199 und 31, 783 sowie aus deren Varianten und Mutanten und Submutanten der Mutanten zusammensetzt.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Zerschneiden mittels der Restriktionsendonuklease, Hind III, erfolgt und das Verbinden durch T<sub>4</sub>DNS-Ligase realisiert wird.
6. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das aufgebaute chimärische Plasmid in einen geeigneten Mikroorganismus eingeführt wird, der Mikroorganismus in einem geeigneten Medium gezüchtet wird und die vom Mikroorganismus erzeugte Alpha-Amylase isoliert wird.