



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1924/82

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 15/76

(22) Indleveringsdag: 29 apr 1982

(41) Alm. tilgængelig: 31 okt 1982

(44) Fremlagt: 25 mar 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 30 apr 1981 DE 3117131

(71) Ansøger: *HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Brueningstrasse 45; D-6230 Frankfurt am Main 80, DE

(72) Opfinder: Alfred *Puehler; DE, Wolfgang *Wohlleben; DE, Michael *Leineweber; DE

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Plasmid p SG 2, fremgangsmåde til dets fremstilling og dets anvendelse

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1924-82

Plasmid p SG 2, der er karakteriseret ved, at det har en molekylvægt på 9,2 megadalton, en konturlængde på 4,58 μ og en molekyllængde på ca. 13,8 kilobaser (kb) og endvidere ikke fragmenteres af restriktions-endonucleaserne EcoR I, BamH I, Sal I, Hpa I og Hind II, men spaltes af restriktions-endonucleasen Hind III til et fragment med en længde på ca. 14 kb, af Cla I til to fragmenter med længderne 10,15 kb og 3,65 kb og af Pst I til to fragmenter med længderne 10,85 kb og 3,0 kb, af Dgl II til to fragmenter med længderne 11,25 kb og 2,6 kb, samt af Bcl I til tre fragmenter med længderne 11,6 kb, 1,25 kb og 1,0 kb, udvindes fra en på i og for sig kendt måde lyseret kultur af *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14 672 ved en alkalisk denaturering med påfølgende renaturering og alkoholfældning.

Plasmidet p SG 2 er egnet til indføring af genetiske ændringer i *Streptomyces*-stammer.

Opfindelsen angår plasmidet p SG 2, en fremgangsmåde til dets fremstilling og dets anvendelse.

Det er fra DE offentliggørelsesskrift nr. 3.005.226 kendt, at plasmidet p UC 6 kan fremstilles ud fra en kultur af *Streptomyces espinosus*. Det er endvidere fra PCT-ansøgning nr. 79/01169 kendt, at der ud fra *Streptomyces lividans* kan fremstilles et plasmid, der synes egnet som vektor til indføring af DNA i mikroorganismer.

Det fremgår heraf, at anvendelsen af genteknologiske metoder på antibiotikadannende *Streptomyces*arter tillægges særlig betydning. Imidlertid er de hidtil kendte metoder forblevet af ringe interesse for praktisk anvendelse.

Den genetiske forbedring af de til antibiotikafremstilling anvendte *Streptomyces*-stammer med det formål at forøge mængden af det dannede antibiotikum er en vigtig opgave. Den kan imidlertid kun løses med held ved genteknologiske metoder, når man har et plasmid til rådighed, der ikke straks igen elimineres fra den som værtscelle anvendte *Streptomyces*-art, som det hyppigt observeres ved arter, der ikke er beslægtet med hinanden.

Det har derfor været opgaven at fremstille tilstrækkelige mængder af et plasmid, der er egnet som vektor til genetisk forbedring af *Streptomyces ghanaensis*-stammer.

Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at denne opgave løses med plasmidet p SG 2, der er ejendommeligt ved, at det kan fremstilles ud fra en kultur af *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14 672 og har en konturlængde på 4,58 μm og en molekyllængde på ca. 13,8 kilobaser (kb), og at det ikke fragmenteres af restriktions-endonucleaserne EcoR I, BamH I, Sal I, Hpa I og Hind II, men spaltes af restriktions--endonucleasen Hind III til et fragment med en længde på ca. 14 kb, af Cla I til to fragmenter med længderne 10,15 kb og 3,65 kb og af Pst I til to fragmenter med længderne 10,85 kb og 3,0 kb, af Bgl II til to fragmenter med længderne 11,25kb og 2,6 kb, samt af Bcl I til tre fragmenter med længderne 11,6 kb, 1,25 kb og 1,0 kb.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af plasmidet p SG 2, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en kultur af *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14 672 lyseres, og plasmidet isoleres.

5 Opfindelsen angår endelig også anvendelsen af plasmid p SG 2 til konstruktion af vektorplasmider.

Den her anvendte stamme af *Streptomyces ghanaensis* er beskrevet i enkeltheder i DE-patentskrift nr. 1.113.791 og betegnes dér *S. ghanaensis* nov. sp. 4092. I en kultur af
10 *Streptomyces ghanaensis* foreligger der pr. celle ca. 10-20 kopier af plasmidet p SG 2. Dette plasmid er således et egnet udgangsplasmid til anvendelse af genteknologiske metoder på både stammen *Streptomyces ghanaensis* selv og på andre *Streptomyces*-arter.

15 Plasmidet p SG 2 har en molekylvægt på ca. 9,2 megadalton og en molekyllængde på ca. 13,8 kilobaser. Dette er påvist ved agarose-gelelektroforese af molekylet selv og dets spaltningsstykker. Bestemmelsen af længden til $4,58 \pm 0,09 \mu\text{m}$ er fremkommet ved elektronmikroskopisk udmåling af
20 27 plasmidmolekyler. Intensiteten af plasmidbåndene ved elektroforesen tillader en vurdering af kopiantallet pr. celle til ca. 10-20. Ved fragmentering af plasmidet p SG 2 med et større antal kendte restriktions-endonucleaser er spaltningsstederne og fragmentlængderne bestemt, og de
25 er sammenfattet i den følgende tabel.

0

Restriktionsforhold for p SG 2 ved behandling af forskellige enzymer:

5	Restriktions- enzym	Antal spalt- ningssteder	Længde af fragmenter	Totallængde
	EcoRI	-		
	BamHI	-		
	SalI	-		
10	HpaI	-		
	HindII	-		
	HindIII	1	~ 14 kb	~ 14 kb
	BglII	2	11,25 kb 2,6 kb	13,85 kb
15	ClaI	2	10,15 kb 3,65 kb	13,8 kb
	PstI	2	10,85 kb 3,0 kb	13,85 kb
20	BclI	3	11,6 kb 1,25 kb 1,0 kb	13,85 kb
	BstEII	8	3,8 kb 2,45 kb 1,9 kb 1,15 kb 1,15 kb 1,0 kb 0,9 kb 0,8 kb	13,65 kb
25	SmaI	10		
	XhoI	10	ikke be-	
	Sau3A	10	stemt	

35

0

Et restriktions-endonuclease-spaltningsbillede af p SG 2 er vist på den vedføjede tegning. På denne kan ses et langt og et kort PstI- hhv. ClaI- og BglIII-fragment samt et langt og to korte BclI-fragmenter. Spaltnings-

5 stedernes position i forhold til hinanden er bestemt ved del- og dobbelt-enzymbehandlinger.

Plasmidet p SG 2 angribes altså overhovedet ikke af restriktions-endonucleaseerne EcoR I, BamH I, Sal I, Hpa I og Hind II, men af restriktions-endonucleasen Hind III spaltes til

10 et fragment med en længde på ca. 14 kb, af Cla I til to fragmenter med længderne 10,15 og 3,65 kb og af Pst I til to fragmenter med længderne 10,85 og 3,0 kb, af Bgl II til to fragmenter med længderne 11,25 kb og 2,6 kb samt af Bcl I i tre fragmenter med længderne 11,6 kb, 1,25 kb og 1,0 kb.

15 Dette mønster tydeliggør, at plasmidet p SG 2 kan anvendes til konstruktion af et vektorplasmid. Ved arbejdet på genetisk ændring af dette plasmid kan der anvendes de samme metoder, som med held er blevet anvendt ved *Escherichia coli*-plasmider og f.eks. er beskrevet af

20 M. Bibb, J.C. Schottel og S.N. Cohen, *Nature* 284, 526-531 (1980), og C.J. Thompson, J.M. Ward og D.A. Hopwood, *Nature* 286, 525-527 (1980).

Således kan der i Hind III-, Cla I-, Bgl II-, Pst I- og Bcl I-spaltningsstederne uden videre indføres

25 antibiotika-resistenser. Endvidere synes det muligt at indføre gener i plasmidet p SG 2, som hos *Streptomyces ghanaensis* fører til en forøgelse af antibiotikaproduktionen. På tale kommer herved både gener for biosyntesevejen og reguleringsgener. Således modificerede p SG 2-

30 -plasmider er ifølge alle indtil nu foreliggende iagttagelser lige så leve- og formeringsdygtige som udgangsplasmidet.

Plasmidet p SG 2 fås ud fra en kultur af *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14 672 ved dyrkning af kulturen på et egnet medium, fragmentering af myceliet, inkubering

35 af det fragmenterede mycelium, høstning af kulturen og påfølgende lysering af myceliet. Isoleringen af plasmidet

0

fra lysatet lykkes ved en alkalisk denaturering, hvorved man lader en ca. 0,1-0,5N natriumhydroxidopløsning, til hvilken der hensigtsmæssigt er sat ca. 1% natriumdodecylsulfat, indvirke på lysatet ved ca. 0°C i indtil 10 minutter.

5

Derefter indstilles der igen til en svagt sur pH-værdi ved tilsætning af en pufferopløsning og opnås derved en renaturering. Derpå centrifugeres blandingen, og ud

10

fra den ovenstående væske fremstilles ved tilsætning af et overskud af ethanol ved -20°C og påfølgende centrifugering en pellet. Denne pellet optages derpå i en pufferopløsning og underkastes i en cæsiumchlorid-ethidiumbromidopløsning en isopyknisk vægtfyldegradientcentrifugering i en ultracentrifuge. Derefter udtages plasmiderne fra gradienten ved punktering, renses chromatografisk og karakteriseres i agarosegel og i elektronmikroskop. Der er her tale om kendte metoder (jfr. R. Radloff, W. Bauer, J. Vinograd. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57, 1514-1521 (1967) og A.A. Szalay, C.J. Mackey, H.W.R. Langridge, Enzyme Microb. Technol. 1, 154-164 (1976).

20

Her og i det følgende er procentangivelserne efter vægt, hvis der ikke er angivet andet.

Eksempel 1

25

Til fremstilling af plasmidet p SG 2 gås der frem på følgende måde:

En kultur af *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14 672 dyrkes i 3-5 dage ved 30°C i 100 ml af et næringsmedium med følgende sammensætning:

30

glucose	1 g
pepton	0,4 g
gærekstrakt	0,4 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
35 K ₂ HPO ₄	0,4 g
glycin	2 g
aq. dest.	ad 100 g

0

Kulturens ovenstående væske fjernes derefter, og restkulturen homogeniseres og centrifugeres derpå i 5 minutter. Efter to ganges vask i en pufferopløsning bestående af 10 mmol tris-HCl og 1 mmol ethylendiamintetra-

5 eddikesyre (pH-værdi 7,5), til hvilken der yderligere er sat 10% saccharose, resuspenderes der i 10 ml af en opløsning med følgende sammensætning.

10

50 mmol glucose
10 mmol EDTA
25 mmol tris-HCl (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
2 mg/ml lysozym

15

Denne opløsning har en pH-værdi på 8.

20

Efter en inkubationstid ved 32°C på 30 til 60 minutter tilsættes der 20 ml frisk fremstillet 0,2N natriumhydroxidopløsning, hvortil der yderligere er sat 1% natriumdodecylsulfat, og blandingen henstilles ved 0°C i 5 minutter. Efter tilsætning af 15 ml af en 3M natrium-

20 acetatopløsning med en pH-værdi på 4,8 blandes der på ny og inkuberes i 1 time ved 0°C. Efter fornyet centrifugering sættes der ved -20°C det tredobbelte volumen ethanol (96%) til den ovenstående væske. Bundfaldet fraskilles ved centrifugering, tørres i vakuum og optages derefter i

25 6 ml af en puffer af 10 mmol tris-HCl og 1 mmol EDTA (pH-værdi 7,5). Derpå centrifugeres der i 2 dage ved 34.000 o/m i en cæsiumchlorid/ethidiumbromid-gradient. Den fraktion, der indeholder plasmiderne, chromatograferes derefter også på apatit.

30

På denne måde isoleres plasmidet p SG 2 i ren form.

Eksempel 2

35

Plasmidet p SG 2 kan også fremstilles på følgende måde:

1 g mycelium af *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14 672 dyrkes i 3-5 dage ved 30°C i det samme medium som beskrevet i eksempel 1. Også her frahældes kulturens ovenstående

0

væske, hvorefter der homogeniseres, og cellematerialet fraskilles ved centrifugering. Derpå vaskes der to gange med en puffer, der består af 10 mmol tris-HCl og 140 mmol NaCl (pH-værdi 8,0). Derefter resuspenderes der i 5 ml af en puffer bestående af 100 mmol tris-HCl, 20 mmol EDTA og 25% saccharose. Derpå tilsættes der 0,1 ml af en lysozymopløsning (30 mg/ml) og inkuberes i 20 minutter ved 25°C. Efter afkøling til 0°C og tilsætning af 6 ml iskoldt vand tilsættes 1 ml af en 1%'s opløsning af natriumdodecylsulfat, og efter tilsætning af yderligere 3,4 ml af en 5M natriumchloridopløsning blandes der forsigtigt. Blandingen henstilles derefter ved 4°C.

Efter at udfældningen ved 4°C er tilendebragt, centrifugeres der i 1 time ved 0°C og 16.000 o/m. Til den ovenstående væske sættes en trediedel af dens volumen af en 42%'s polyethylenglycolopløsning (molekylvægt af polyethylenglycolen:6000), hvorved der fremkommer et bundfald. Efter at udfældningen ved en temperatur på 4°C er tilendebragt, fraskilles plasmiderne ved centrifugering ved 16.000 o/m i 15 minutter, hvorefter den dannede pellet forsigtigt optages i 1 ml af en 0,4%'s opløsning af Sarkosyl (N-lauroyl-sarkosid) i en puffer bestående af 10 mmol tris-HCl og 1 mmol EDTA (pH-værdi 7,5). Med den samme puffer fyldes der til slut op til 5 ml og centrifugeres i cæsiumchlorid-ethidiumbromid-gradient i en ultracentrifuge. Derefter arbejdes der videre som i eksempel 1.

30

35

P a t e n t k r a v .

1. Plasmid p SG 2, k e n d e t e g n e t ved, at det kan fremstilles ud fra en kultur af Streptomyces ghanaensis ATCC 14 672 og har en konturlængde på 4,58 μ m og en
5 molekyl-længde på ca. 13,8 kilobaser (kb), og at det ikke fragmenteres af restriktions-endonucleaserne EcoR I, BamH I, Sal I, Hpa I og Hind II, men spaltes af restriktions-
-endonucleasen Hind III til et fragment med en længde på ca. 14 kb, af Cla I til to fragmenter med længderne 10,15
10 kb og 3,65 kb og af Pst I til to fragmenter med længderne 10,85 kb og 3,0 kb, af Bgl II til to fragmenter med længderne 11,25 kb og 2,6 kb, samt af Bcl I til tre fragmenter med længderne 11,6 kb, 1,25 kb og 1,0 kb.

2. Fremgangsmåde til udvinding af plasmidet p SG 2,
15 k e n d e t e g n e t ved, at en kultur af Streptomyces ghanaensis ATCC 14 672 lyseres og plasmidet isoleres.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at plasmidet isoleres fra lysatet ved en alkalisk denaturering med påfølgende renaturering og alkoholfældning.

20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e -
t e g n e t ved, at kulturen af Streptomyces ghanaensis ATCC 14 672 lyseres ved en temperatur på ca. 0°C med en detergent i en mængde på ca. 0,1 vægtprocent.

5. Anvendelse af plasmid p SG 2 til konstruktion af
25 vektorplasmider.

