



## Ausschliessungspatent

Erteilt gemäÙ § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

# 1589 17

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

3(51) C 12 N 15/00  
C 12 N 9/28

### AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2276 567  
(31) 8005184;8011482

(22) 16.02.81  
(32) 15.02.80;10.04.80

(44) 09.02.83  
(33) GB;GB

(71) siehe (73)

(72) COLSON, CHARLES A.,PROF.;CORNELIS, PIERRE E.;DIGNEFFE, COLETTE S.;WALON, RAOUL G. P.;BE;  
WALON, CORRINE;BE;

(73) CPC INTERNATIONAL INC, NEW JERSEY;US;

(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN), 1020 BERLIN, WALLSTRASSE 23/24

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER EIN AMYLASE CODIERENDES GEN ENTHALTENDEN  
REKOMBINANTEN DNS

(57) Die Erfindung betrifft eine neue rekombinante DNS, die ein Amylase codierendes Gen enthält und durch ein in vitro Verfahren hergestellt wird, bei dem die von einem bakteriellen Donatormikroorganismus stammende DNS aufgespalten wird und die resultierenden DNS-Fragmente mit einem Vektor verbunden werden, der auf ähnliche Weise aufgespalten worden ist, gekennzeichnet dadurch, daß der Vektor ein Plasmid oder die DNS eines Derivates des Phagen Lambda ist. Die Erfindung betrifft weiterhin genetisch hergestellte Mikroorganismen, die die neue DNS enthalten, Verfahren zur Herstellung der neuen DNS und neue Amylaseenzyme, deren Herstellung aus der DNS und deren Anwendung zur Hydrolyse von Stärke. Der Donatormikroorganismus ist vorzugsweise ein Bacillus- oder ein Klebsiellastamm. Der Vektor kann ein Phage oder ein Plasmid sein. Der Wirtsmikroorganismus ist vorzugsweise E. coli oder B. subtilis. Das hergestellte Amylaseenzym ist vorzugsweise eine Alpha-Amylase, eine Beta-Amylase oder eine Pullulanase.

Verfahren zur Herstellung einer ein Amylase codierendes Gen enthaltenden rekombinanten DNS

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung aus dem Bereich des genetic engineering betrifft, im besonderen auf die Herstellung von rekombinanter, ein Amylase codierendes Gen enthaltender DNS (Desoxyribonukleinsäure) sowie auf die Nutzung derselben zur Herstellung von Mikroorganismen mit dem Ziel der umfangreichen Produktion von amylolytischen Enzymen.

Obwohl der Begriff "genetic engineering" bzw. genetisches Ingenieurwesen häufig verwendet wird, um eine große Anzahl von Techniken zur künstlichen Modifikation der genetischen Information eines Organismus zu beschreiben, wird er in der folgenden Beschreibung und im Erfindungsanspruch lediglich für die in-vitro-Technik der Bildung rekombinanter DNS aus einem Donator-Mikroorganismus und einem geeigneten Vektor, für das Selektieren auf Basis der erwünschten genetischen Information und für das Einführen der selektierten DNS in einen geeigneten Mikroorganismus (Wirts-Mikroorganismus) benutzt, wobei die erwünschte (fremde) genetische Information Teil des genetischen Komplements des Wirtes wird. Der Begriff "genetisch modifizierter Mikroorganismus", wie er nachfolgend verwendet wird, bezieht sich auf einen mit Hilfe dieser Technik veränderten Mikroorganismus.

Die Begriffe "Amylase" und "amylolytisches Enzym" sind

Synonyma und beziehen sich nachfolgend im weitesten Sinne auf jene zur Katalyse der Stärkehydrolyse fähigen Enzyme wie etwa Alpha-Amylase, Beta-Amylase, Iso-Amylase (einschließlich der Alpha-1,6-glukosidasen wie etwa Pullulanase), Glukoamylase usw..

#### Bekannte technische Lösungen

Selbstverständlich ist in den letzten Jahren bereits sehr viel über genetisches Ingenieurwesen geschrieben worden (zwei der vielen ausgezeichneten Arbeiten sind "DNS-Klonung und die Analyse der Plasmidstruktur und -funktion" von K. N. Timmis, S. N. Cohen und S. C. Cabello, Prog. Molec. subcell Biol. 6, 1978, Seiten 1...58 und "Lamboid-Phagen, die die Rückgewinnung von in-vitro-Rekombinanten vereinfachen" von Noreen E. Murray, W. J. Brammer und K. Murray, Molec. gen. Genet. 150, 1977, Seiten 53...56), einschließlich vieler Berichte über neue, genetisch modifizierte Mikroorganismen mit wertvollen Eigenschaften. Die JA-PS SHO 52-76480 offenbart die Herstellung von Mikroorganismenstämmen hoher Amylaseproduktion mit Hilfe von in-vivo-Techniken der Mutagenese, Transduktion und Transformation zur Akkumulation verschiedener genetischer Merkmale zwecks Amylaseproduktion in einem Bacillus-Mikroorganismus. Diese Techniken, die mit der Gentechnik im hier definierten Sinne nichts gemein haben, sind auf einen einzelnen Mikroorganismus oder einige wenige (genetisch gesprochen) eng verwandte Mikroorganismen begrenzt. Auch sind diese Stämme für die in der vorliegenden Erfindung für die gesteigerte Enzymproduktion genutzte Gen-Verstärkung (z. B. durch Phage oder Plasmid) nicht zugänglich. In einem jüngst von Yuko Yoneda, Scott Graham und Frank E. Young veröffentlichten Artikel "Klonierung eines Alpha-Amylase codierenden Fremdgens in Bacillus subtilis", Biochemical and Biophysical Research Communications 91, Nr. 4,

Seiten 1556...1564 (28. Dezember 1979) beschreiben die Autoren das Klonieren eines Alpha-Amylase codierenden Gens in einen Bacillus subtilis durch Verbinden gespaltenen DNS von Bacillus amyloliquefaciens H mit der DNS des gemäßigten Phagen phi 3T und anschließendes Transformieren von Amylase-schwachen Bacillus-subtilis-Zellen. Die Autoren geben keinen Hinweis zur Verstärkung des Gens und eine damit verbundene verstärkte Produktion des Amylaseenzyms, worin der Hauptzweck der hier vorliegenden Erfindung besteht.

#### Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, Amylase-Enzym in großem Umfang herzustellen.

#### Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das mit Hilfe genetisch modifizierter Mikroorganismen arbeitet, um dabei unter geeigneten Kultivierungsbedingungen erheblich größere Mengen an amyolytischen Enzymen als der Donor-Mikroorganismus produzieren zu können.

In einer bevorzugten Ausführungsform verfügen die so erzeugten Amylasen über eines oder mehrere Merkmale, die sie insbesondere für industrielle enzymatische Stärke-Hydrolysen (z. B. die enzymatische Verflüssigung und/oder Verzuckerung von Stärke zur Erzeugung von Bindemitteln, Leimen, Maltodextrinen, Stärkesirupe unterschiedlicher Zusammensetzungen, Maltose, Dextrose usw.) geeignet machen, wie beispielsweise Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperatur, Widerstandsfähigkeit gegen giftiges Schwermetall usw.

Erfindungsgemäß wird zuerst DNS aus einem bakteriellen Mikroorganismus (dem Donor-Mikroorganismus), der zur Produktion mindestens eines amyolytischen Enzyms fähig ist, extrahiert. Dann erfolgt das Spalten (mit einem geeigneten

Restriktionsenzym) der DNS sowie als Vektor der DNS eines Phagen-Lambda-Derivates und schließlich werden die resultierenden Fragmente zwecks Bildung der rekombinanten DNS, von denen einige ein Amylase codierendes Gen enthalten werden, kombiniert und verbunden. Die rekombinanten DNS werden dann durch Insertion in geeignete Wirtszellen (z. B. E. coli) mittels in-vitro-Enkapsidation oder Transfektion biologisch aktiviert.

Die hieraus hervorgegangenen Klone werden nun hinsichtlich des Vorhandenseins eines Amylase codierenden Gens überprüft, ein oder mehrere positive Klone werden ausgewählt und vermehrt, womit neue genetisch modifizierte bakterielle Mikroorganismen entstehen, die unter geeigneten Kultivierungsbedingungen wesentlich größere Amylasemengen erzeugen, als sie von den Donor-Mikroorganismen produziert werden können. Die DNS des neuen Phagen kann gegebenenfalls extrahiert, gespalten und in einen zweiten Vektor subkloniert werden, der seinerseits entweder ein Plasmid oder ein anderer Phage sein kann. Die neuen Klone können erneut im Hinblick auf das Vorhandensein eines Amylase codierenden Gens überprüft und selektiert werden. Desgleichen können weitere "Sub-sub-Klonierungen" vorgenommen werden.

Zusätzlich zur Erstellung neuer, genetisch modifizierter Mikroorganismen mit der Eigenschaft von Amylase-"Überproduzenten" weist die Erfindung den weiteren Vorteil auf, daß der Transfer vorrangig jenes für die Produktion eines einzelnen amylytischen Enzyms zuständigen Gens erfolgt, wodurch die bei Kulturen von nicht genetisch modifizierten Mikroorganismen notwendige Reinigung weitgehend eingeschränkt wird.

Wenn der die erwünschte rekombinante DNS enthaltende genetisch modifizierte Mikroorganismus einmal hergestellt worden ist, dann wird er in einer Weise kultiviert, die den

Anteil an rekombinanter DNS verstärkt und somit Amylase in wesentlich größeren Mengen bereitgestellt, als dies durch den Donor-Mikroorganismus möglich ist.

Wenn es sich bei dem Vektor um ein Derivat des Phagen Lambda handelt - in diesem Fall muß der Wirts-Mikroorganismus E. coli sein - kann Amplifikation und Enzymproduktion folgendermaßen realisiert werden. Ist der Phage lytisch, so wird der Wirts-Mikroorganismus, beispielsweise E. coli, zunächst zur Vermehrung der Zellen bis zur geeigneten Dichte kultiviert, die Zellen dann mit einer ausreichenden Menge des Bakteriophagen infiziert und schließlich das System bis zur Zerstörung der Zellwände kultiviert. Die Amylase dringt dann in das Kulturmedium ein.

Handelt es sich bei dem Vektor-Wirt-System um ein geeignetes Lambda-lysogenes E. coli, dann wird der infizierte Wirts-Mikroorganismus zunächst zwecks Vermehrung der bakteriellen Zellen bis zur geeigneten Dichte bei 32 °C kultiviert. Danach wird die Temperatur auf 42 °C gesteigert und für eine bestimmte Zeit auf dieser Höhe gehalten, um den lytischen Zyklus zu induzieren. Anschließend wird die Temperatur auf 37 °C eingestellt, um die Amplifikation der fremden vorhandenen DNS mit der sie begleitenden umfangreichen Amylaseproduktion in Gang zu setzen. Die Zellwände werden möglicherweise zerstört, abhängig von den jeweiligen Bedingungen, wobei es in einem solchen Fall zum Übertritt von Amylase in das Kulturmedium kommt.

Handelt es sich bei dem Vektor um ein Vielfachplasmid wie etwa pBR 322 oder pACYC 184, dann wird die Amplifikation der fremden DNS per se erreicht. Anderenfalls wird der die Plasmid-DNS enthaltende, genetisch modifizierte Mikroorganismus zunächst zwecks Vermehrung der bakteriellen Zellen bis zur gewünschten Dichte kultiviert, danach wird Chloramphenicol zugesetzt. Da das Antibiotikum die Proteinsynthe-

se inhibiert, verhindert es weitere Zellteilung und Amylaseproduktion, erlaubt aber die Amplifikation der Plasmid-DNS in den Zellen. Abschließend werden die Zellen vom Kulturmedium getrennt und zur Entfernung des Chloramphenikols gewaschen. Zur Amylaseproduktion werden die Zellen dann selbstverständlich in Abwesenheit von Chloramphenikol rekultiviert.

Selbstverständlich muß bei jedweder genetischen Modifikationstätigkeit "markiert" werden können, wodurch es gelingt, die Klonen mit der gewünschten genetischen Information zu selektieren. Praktisch kann dies erfindungsgemäß leicht durch Anlegen einer Plattenkultur auf stärkehaltigem Medium realisiert werden, wenn die Aktivität von Alpha-Amylase, Beta-Amylase oder Glukoamylase zu ermitteln ist. Das Kulturmedium wird sodann mit Iod gefärbt. Klone, die auf einem stärkehaltigen Medium Amylaseaktivität entfalten, sind von einer weißen Fläche umgeben. Eine spezifische, besser geeignete Färbemethode wird weiter unten beschrieben. Geht es um die Auffindung von Pullulanaseaktivität, dann werden die Klone nach dem Plattenverfahren auf einem Pullulan enthaltenden BBL-Tryptikase-Medium gebracht. Diese Technik wird weiter unten detaillierter beschrieben.

Es folgt nun eine detailliertere Beschreibung einschließlich der spezifischen Materialien und der angewendeten Techniken. Man wird bemerken, daß viele der genutzten Techniken "Standard" darstellen und dem Fachmann auf diesem Gebiet wohlbekannt sind; zur Gewährleistung einer klaren Aussage sollen nichtsdestoweniger auch einige dieser Techniken im Detail beschrieben werden.

Donator-Mikroorganismus. Der Donator-Mikroorganismus sollte ein bakterieller Mikroorganismus und in der Lage sein, mindestens eine Amylase (einschließlich natürlich der gewünschten Amylase) zu produzieren; vorteilhafterweise soll-

te er zu einer Amylase mit den in der industriellen Stärkehydrolyse erwünschten Eigenschaften wie beispielsweise Hitzeunempfindlichkeit oder Widerstandsfähigkeit gegen Metallgifte führen. Bei dem Donator könnte es sich auch um einen eukaryotischen amylaseproduzierenden Mikroorganismus (z. B. einen Pilz oder eine Hefe) handeln. Wegen der relativen Einfachheit des Arbeitens mit einer prokaryotischen DNS-Quelle im Vergleich zu den Eukaryoten, beschränkt sich diese Arbeit auf Bakterien und ist daher auf die Verwendung eines bakteriellen Donators begrenzt. Wie aus den Beispielen zu entnehmen, sind Kulturstämme von *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus* und *Klebsiella pneumoniae* zur Erzeugung genetisch modifizierter Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Bildung großer Mengen von Alpha-Amylase, hitzebeständiger Alpha-Amylase, Beta-Amylase und Pullulanase erfolgreich eingesetzt worden.

Ligasen und Restriktionsenzyme. Es wurde durchweg T4-DNS-Ligase als verbindendes Enzym benutzt. Es kann aber auch jedes andere DNS-verbindende Enzym verwendet werden. Die eingesetzten spezifischen Restriktionsenzyme werden in den Beispielen erläutert. Die Auswahl eines geeigneten Restriktionsenzym kann vom Fachmann unter Nutzung bekannter Techniken natürlich selbst vorgenommen werden. Die hier verwendete Methode der Selektion eines Restriktionsenzym zur weiteren Versuchsdurchführung bestand im Abspalten der vom Donator-Mikroorganismus extrahierten DNS (der Donator-DNS) durch verschiedene Restriktionsenzyme sowie im Auswählen des einen (oder auch mehr als einen) für die Weiterarbeit bestgeeigneten Enzyms, wobei von der Fähigkeit des Enzyms, die DNS in zahlreiche Fragmente im Größenbereich von 2...15 Kilobasen zu schneiden, ausgegangen wurde.

Vektoren. Aus verschiedenen Gründen sind insbesondere Derivate des Phagen Lambda für die Klonierung der vom Donator



extrahierten DNS geeignet. (1) Mutanten des Phagen Lambda mit Verluststellen ermöglichen den Einbau von fremden DNS-Fragmenten verschiedener Größen (in Abhängigkeit natürlich vom spezifischen Lambda-Derivat und ermöglichen weiterhin die einfache Identifikation jener Klone, die fremde DNS enthalten. (2) Es sind verschiedene Derivate des Phagen Lambda entwickelt worden, die den Einsatz von mehreren Restriktionsenzymen gestatten und somit die Chancen für ein erfolgreiches Klonieren steigern. (3) Bei Verwendung geeigneter Derivate des Phagen Lambda sind sehr gute Amplifikationen von Fremdgenen möglich. (4) Nach der Ligation kann die Rückgewinnung der rekombinanten Klone unschwer durch Transfektion oder in-vitro-Zusammenschluß erfolgen. Auf Grund seiner Vielseitigkeit, die kein anderer gegenwärtig existierender Vektor vermittelt, werden erfindungsgemäß Derivate des Phagen Lambda sowie E. coli als Wirt zur Initialklonierung der vom Donator extrahierten DNS eingesetzt.

Weitere Vorteile der Verwendung eines Phagen anstelle eines Plasmids zur primären Klonierung sind: (1) Der Prozentsatz von Rekombinanten mit fremden DNS-Einlagerungen ist höher; (2) Die Bakterien liegen in gelöstem Zustand vor, wodurch die Zellinhalte und damit jegliche Amylase im Medium freigesetzt werden und damit die Nachweisführung mit Hilfe der Iod-Färbetechnik erleichtert wird; (3) Die Widerstandsfähigkeit eines Phagen gegenüber Iod ist größer als die Widerstandsfähigkeit irgendeines lebenden Bakteriums.

Dem versierten Genetiker fällt die Auswahl eines geeigneten Plasmids als Vektor für eine Sub-Klonierung nicht schwer, ein Grund natürlich, das Vorhandensein eines einzelnen oder einer begrenzten Anzahl von Restriktionsstellen für das Restriktionsenzym auszunutzen.

Die im größten Teil der vorliegenden Erfindung verwendeten

Plasmide sind pBR 322 und pACYC 184. Im intakten Zustand überträgt das Plasmid pBR 322 Resistenz gegenüber Ampicillin und Tetrazyklin und enthält eine einzelne Restriktionsstelle jeweils für Pst I-, Eco RI-, Hind III-, Bam HI- und Sal I-Enzyme. Schneiden und Einbau an der Pst I-Stelle zerstört die Fähigkeit zur Übertragung von Resistenz gegenüber Ampicillin, während Einbau in die Bam HI- und Sal I-Stellen die Widerstandsfähigkeit gegenüber Tetrazyklin aufhebt. Einbau in die Hind III-Stelle zerstört mitunter die Resistenz gegenüber Tetrazyklin, vorausgesetzt, das klonierte Gen besitzt keinen eigenen Promotor.

Im intakten Zustand überträgt das Plasmid pACYC 184 Resistenz gegenüber Tetrazyklin und Chloramphenikol und enthält einzelne Restriktionsstellen jeweils für Eco RI-, Hind III-, Bam HI- und Sal I-Enzyme. Schneiden und Einbau an der Eco RI-Stelle zerstört die Fähigkeit zur Übertragung von Resistenz gegenüber Chloramphenikol, während Einbau an den drei anderen Stellen für Hind III, Bam HI und Sal I die gleichen Wirkungen wie beim Plasmid pBR 322 hat, da diese Region beiden Plasmiden gemeinsam ist.

Für die Sub-Klonung in *Bacillus subtilis* wurde das Plasmid pC 194 als Vektor verwendet. Dieses Plasmid hat eine einzelne Hind III-Stelle und überträgt Resistenz gegenüber Chloramphenikol.

Wirtsmikroorganismus. Da Abkömmlinge des Phagen Lambda nur in E. coli exprimiert werden können, kommt notwendigerweise auch nur E. coli als Wirt für die gemäß der Erfindung hergestellte rekombinante Phagen-DNS in Frage. Liegt andererseits die rekombinante DNS in Form eines Plasmids vor, dann kann jedweder zur Annahme und Replikation derartiger Plasmid-DNS fähige Mikroorganismus, wie beispielsweise andere bakterielle Mikroorganismen oder Hefen wie etwa *Saccharomyces cerevisiae* verwendet werden.

Aus praktischen Gründen heraus wurden bei einem Großteil dieser Arbeit E. coli-Kulturstämme (z. B. HB 101) genutzt, da sie in genetischer Hinsicht wohlbekannt sind, von bekannten Phagen und Plasmiden infiziert werden und daraufhin eine gesteigerte Kapazität zur Enzym-Überproduktion zeigen.

Wie in Beispiel II A beschrieben, kann die Subklonierung eines rekombinanten Plasmids in ein zur Replikation in *B. subtilis* befähigtes Plasmid wie pC 194 vorgenommen werden.

Verfahren. Das Verfahren wird als zweistufiger Klonierungsversuch beschrieben, wobei in der ersten Phase ein Phage und im zweiten Stadium ein Plasmid verwendet wird.

Nach dem Auswählen des Donator-Mikroorganismus, der Restriktionsenzyme und Ligasen sowie des spezifischen Derivats vom Phagen Lambda werden deren DNS extrahiert, gespalten (restricted), gemischt und die übereinstimmenden Stücke verbunden - all dies mittels herkömmlicher Techniken, die hier keiner Beschreibung bedürfen.

Nun wird die DNS durch Transfektion oder in-vitro-Enkapsidation in E. coli biologisch aktiviert. Bei der vorliegenden Arbeit mit Lambda-DNS wurde in Anwendung der Enkapsidation ein sehr guter Erfolg erzielt (B. Hohn und K. Murray, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3259 bis 3263, 1977).

Die mit fremder DNS versehenen Klone werden anschließend durch geeignete Methoden identifiziert. Wird ein Insertionsvektor wie etwa Lambda NM 590 oder Lambda NM 607 verwendet, dann bilden die Fremd-DNS enthaltenden Klone klare Plaques, während die Klone ohne Fremd-DNS trübe Plaques ergeben. Bei Verwendung eines Ersatz-Vektors wie etwa Lambda NM 761 oder Lambda NM 781 kann die Identifikation durch Plattenkultur auf einem E. coli Bernsteinlack-

Rezipienten auf Laktose-Indikatormedium wie z. B. McConkey, EMB oder X gal vorgenommen werden.

Viele (mehrere Tausend) jener Klone, die fremde DNS aufgenommen haben, werden daraufhin im Plattenverfahren auf stärkehaltigen Medien angesetzt und mit Hilfe der bereits erwähnten Iod-Färbemethode hinsichtlich der Anwesenheit eines Amylase codierenden Gens durchgeprüft. Mit großer Sorgfalt muß selbstverständlich darauf geachtet werden, daß keine zu hohe, den Phagen tötende Iod-Konzentration angewendet wird; dies kann sich als problematisch erweisen, da das Iod in Form einer Lösung zugesetzt wird. Die bevorzugte Färbetechnik bestand in einer kurzzeitigen Exposition der Platten gegenüber Iod-Dämpfen. Diese Technik wurde mit sehr gutem Erfolg angewendet.

Im folgenden soll eine vorteilhafte Methode zur Auffindung von Klonen mit Pullulanase-Aktivität beschrieben werden, bei der keine Iod-Färbung vorgenommen wird. Die Phagen werden im Plattenverfahren auf Petrischalen angesetzt, welche BBL-Tryptikase plus Pullulan in einer Konzentration von etwa 0,25 % enthalten. Das Pullulan im Medium um die "positiven" Plaques herum wird durch die Pullulanase zu Maltotriose hydrolisiert, wobei die Maltotriose ihrerseits von den Bakterien verbraucht wird. Damit gedeihen die durch die Maltotriose ernährten Bakterien besser als die im Umfeld befindlichen; als Folge erscheinen die Pullulanase produzierenden Plaques von einem undurchsichtigen Ring wachsender Bakterien umgeben und können somit leicht nachgewiesen werden. Diese Technik wird in Beispiel IV detailliert beschrieben.

Ein (oder mehrere) positiver Klon wird nun aufgenommen und vermehrt. Dabei kann es sich um den "endgültigen" genetisch modifizierten Mikroorganismus handeln, welcher nun zur Erzeugung großer Amylasemengen durch geeignete Kultivierung

in der bereits beschriebenen Weise verwendet werden kann. Andererseits kann der Klon als DNS-Quelle für eine zweite Klonierung in ein Plasmid oder einen anderen, besser geeigneten Phagen herangezogen werden. Im folgenden soll das Verfahren der Subklonung in ein Plasmid beschrieben werden.

Die DNS der Klone wird ebenfalls unter Zuhilfenahme von Standard-Techniken extrahiert und mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Das Plasmid wird in ähnlicher Weise geschnitten, die Fragmente werden vermischt und die rekombinierten Fragmente miteinander verbunden. Bei Verwendung des Plasmids pBR 322 erfolgt der Nachweis jener Klone, die DNS mit einem Amylase codierenden Gen aufgenommen haben, durch biologische Aktivierung in einem Wirt wie etwa E. coli. Dies erfolgt in Abhängigkeit vom verwendeten Restriktionsenzym durch Transformation in einem Ampicillin oder Tetracyclin enthaltenden Kulturmedium. Das Kulturmedium soll ebenfalls Stärke oder Pullulan enthalten, und die Identifikation der Klone mit einem Amylase codierenden Gen erfolgt gemäß einer der bereits beschriebenen Techniken. Positive Klone werden anschließend kultiviert und die Plasmid-DNS kann dann mit Chloramphenikol in der bereits geschilderten Weise amplifiziert werden.

Die Zeichnungen vermitteln die Struktur des Wildtyp-Bakteriophagen Lambda (Fig. 1 a) und aller verwendeten Vektoren sowie der nach den folgenden Beispielen gewonnenen neuen rekombinanten Plasmiden. Im einzelnen enthält Fig. 1 darüber hinaus Darstellungen der Phagen Lambda NM 590 (b) und Lambda NM 781 (c), (Murray, N. E., Brammar, W. J., Murray, K., (1977) Molec. gen. Genet. 150, 53 - 61). Fig. 2 enthält die Struktur der Plasmide pBR 322 (Bolivar, F., Rodriguez, R. I., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W. (1977), Gene 2, 95 - 113) und pACYC 184 (Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. (1978) J. Bact. 134, 1141 - 1156).

Fig. 3 stellt die Struktur des neuen Plasmids pCP 1 dar und Fig. 4 die des neuen Plasmids pCP 2.

Fig. 5 erläutert das Beispiel II A durch Darstellung der Plasmide pC 194, pCP 2,3 und des neuen "End"-Plasmids PCH 1.

Fig. 6 und 7 zeigen die Plasmide pCP 3 bzw. pCP 4.

In allen Darstellungen der neuen rekombinanten Plasmide ist die Donator-DNS durch eine stark gezogene Linie gekennzeichnet.

Die Beispiele sollen die Praxis der Erfindung veranschaulichen. Sie dienen lediglich erläuternden Zwecken und sollten nicht im Sinne irgendeiner Begrenzung der Erfindung ausgelegt werden.

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die mitgeteilten Prozentsätze auf Masse-Prozent. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der NIH (U.S.A.)-Richtlinien angestellt.

### Beispiel I

#### Klonierung eines Alpha-Amylase-Gens

Verwendet wurden die folgenden Materialien:

Restriktions-Endonuklease Hind III.

T4 DNS Ligase.

Phage Lambda NM 590. Die Phagen-DNS wurde durch Phenol-extraktion aus hochreinen Phagenpartikeln gewonnen.

Plasmid pBR 322. Plasmid-DNS wurde aus Lysozym-lysierten E. Coli-Zellen in Caesiumchlorid-ethidiumbromid Dichtegradienten isoliert.

Wirts-Mikroorganismus, E. coli HB 101.

Als Donor-Mikroorganismus diente ein Kulturstamm von

*Bacillus megaterium* mit nachstehenden mikrobiologischen Eigenschaften:

- (1) Morphologie: stäbchenförmig ( $0,5 \dots 0,7 \mu \times 2,0 \dots 5,0 \mu$ ),  
beweglich, grampositiv, terminale bis  
subterminale Sporen.
- (2) Nährbouillon: gutes Wachstum.
- (3) Nähragarbouillon: gutes Wachstum; die Kolonien sind in  
der Mitte dichtgelagert, im Randgebiet diffuser.
- (4) Milch: Peptonisation ohne Veränderung des pH-Wertes.
- (5) Gelatine: keine Verflüssigung.
- (6) Reduktion von Nitraten: negativ.
- (7) Katalasereaktion: negativ.
- (8) Oxidasereaktion: negativ.
- (9) Zytochrom-Oxidasereaktion: negativ.
- (10) Indolproduktion: negativ.
- (11)  $H_2S$ -Bildung: negativ.
- (12) Kohlenhydratausnutzung: verwertet Arabinose, Xylose,  
Galaktose, Glukose, Lävulose, Maltose, Raffinose, Sac-  
charose sowie Stärke und produziert daraus Säure. Rham-  
nose, Mannose, Melibiose, Inulin und Salizin werden  
nicht verwertet.
- (13) Verwertung von Polyolen: Sorbitol und Mannitol werden  
verwertet; Adenitol, Dulcitol und Inositol werden  
nicht verwertet.
- (14) Dekarboxylasereaktion auf Lysin: negativ.
- (15) Ureolyse: schwach.
- (16) Widerstandsfähigkeit gegenüber Schwermetallen: wächst  
direkt auf 500 ppm  $Cr^{+++}$ .
- (17) Natriumchlorid-Bouillon: Wachstum bei NaCl-Konzentra-  
tion von 3,5 %.
- (18) Optimale Wachstumstemperatur:  $30 \dots 37^\circ C$   
Maximale Wachstumstemperatur:  $40 \dots 50^\circ C$   
Minimale Wachstumstemperatur:  $5 \dots 20^\circ C$ .
- (19) Sauerstoffbedarf aerobisch.

227656 7 - 15 -

Der Mikroorganismus wurde auf der Grundlage seiner mikrobiologischen Eigenschaften unter Bezug auf Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8. Auflage), Mitherausgeber R. E. Buchanan und N. E. Gibbons, Williams und Wilkins Company, Baltimore, Maryland als *Bacillus megaterium* identifiziert. Der Mikroorganismus ist am 12. Februar 1980 bei der Nationalen Sammelstelle für industrielle Bakterien (NCIB), Torry Forschungsstation, Postfach Nr. 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Schottland hinterlegt und unter NCIB Nr. 11568 registriert worden. Im folgenden wird das angewendete Verfahren beschrieben.

#### A. IN-VITRO-REKOMBINATION ZWISCHEN LAMBDA- UND B.-MEGATERIUM-DNS'n

Etwa 7  $\mu$ g B.megaterium-DNS wurden mittels 10 Einheiten Hind III bei 37 °C eine Stunde lang in 25  $\mu$ l Tris-Puffer (pH 7,5) gespalten. Etwa 2  $\mu$ g Lambda NM 590 wurden in ähnlicher Weise mit dem gleichen Enzym gespalten. Die Reaktionen wurden durch 10-minütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt.

Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Spaltung wurden zwei Tests vorgenommen:

1. Je eine Probe der zwei Reaktionsgemische wurde in einem Agarose-Gel über 20 Stunden hinweg bei 20 Volt elektrophoretisch behandelt. Nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid wurden die erwarteten Bandenverteilungen untersucht:  
2 Lambda-DNS-Banden als Ergebnis der an der einzelnen Hind-III-Stelle aufgebrochenen Lambda-DNS und eine sehr große Anzahl meist überlappender Banden von der an einer Vielzahl von Stellen aufgespaltenen bakteriellen DNS.



2. Die Transfektionsanalyse der Phagen-DNS zeigte, daß die Aufspaltung mit 99 %iger Wirksamkeit erfolgte, wodurch die biologische Aktivität der Phagen-DNS nahezu vollständig zerstört wurde.

Die aufgebrochenen DNS'n wurden vermischt und 5stündiger Inkubation mit 0,15 Einheiten T4-DNS-Ligase bei 10 °C ausgesetzt, um ein zufallsweises Anordnen und kovalentes Verschmelzen der DNS-Fragmente zu ermöglichen.

Am Ende dieser Inkubation wurde die DNS mit einem in-vitro-Enkapsidationspräparat vereinigt, das aus einer Mischung der von nichtsuppressiven Kulturstämmen induzierten Lysate zweier komplementärer defektiver Phagen (Lambda Dam und Lambda Bam) bestand. In dieser Mischung kann jegliches DNS-Molekül in das Phagen-Protein eingebunden werden, sofern es die cos-Extremitäten der Lambda-DNS besitzt und die geeignete Größe aufweist. Auf diese Weise rekonstituiert sich in vitro ein biologisch aktiver Phagen-Partikel, der E. coli infizieren und ein Infektionszentrum (Plaque) produzieren kann.

Um die Wirksamkeit dieses Vorgehens abzuschätzen, wurden zwei Kontrollen vorgenommen:

1. Eine Probe der Mischung wurde im Plattenverfahren auf E. coli kultiviert, pro  $\mu\text{g}$  der eingebrachten Lambda-DNS wurden  $3 \times 10^5$  Einzel-Plaques gefunden. Dies überstieg die in dem aufgespaltenen Präparat gefundene Menge etwa um das Hundertfache, womit auf eine gute Wirkung der Ligase-Behandlung geschlossen werden kann.
2. Die derart entstandenen Plaques wurden visuell beurteilt.

227656 7 - 17 -

70 % von ihnen zeigten keinerlei Trübung, was auf die Anwesenheit eines B. megaterium-DNS-Fragments hindeutet, welches seinerseits das für die Plaque-Trübung verantwortliche Lambda-Gen C1 bindet und damit inaktiviert.

Somit könnte man annehmen, daß das Präparat ein Zufalls-muster aller mit dem Einbau in den Phagen Lambda NM 590 verträglichen B. megaterium-möglichen Hind III-DNS-Fragmente enthielt.

#### B. ISOLATION EINES B. MEGATERIUM-AMYLASE TRAGEN- DEN PHAGE-LAMBDA-DERIVATES

Der Rückstand der Enkapsidations-Mischung wurde zur Inokulation von E. coli auf eine große Anzahl von stärkeenthaltenden Platten mit etwa  $10^3$  lebensfähigen Partikeln pro Platte verwendet. Nach Anwachsen der infizierten E. Coli und Bildung von Plaques wurden die Platten hinsichtlich der Anwesenheit von stärkeabbauenden Plaques überprüft. Dazu wurden die Platten kurzzeitig Iod-Dämpfen ausgesetzt; es wurde erwartet, daß der von einem solchen Phagen hervorgerufene Belag (Plaque) von einer durchsichtigen Fläche umgeben sein würde, resultierend aus der Diffusion und Wirkung von Amylase aus den lysierten Zellen. Ein derartiger Belag wurde gefunden, der ihn enthaltende Phage wurde zwecks Subkultivierung sofort herausgenommen (ein längeres Verweilen in Iod-Dämpfen würde den Phagen getötet haben). Die Nachkommenschaft dieses Plaque vermehrte sich unverändert (Amylase erzeugend) und wird hier als "Lambda NM 590 Amy 1" bezeichnet. Phage Lambda NM 590 Amy 1 wurde am 12. Februar 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11569 hinterlegt.

#### C. RE-KLONIERUNG DES AMYLASE-GENS IN DAS PLASMID PBR 322

Die Re-Klonierung erfolgte zwecks Erlangung eines überpro-

duzierenden Kulturstammes sowie zwecks unkomplizierter Herstellung einer großen Menge von DNS mit dem Amylase-Gen.

1  $\mu$ g DNS vom Phagen Lambda NM 590 Amy 1 und 0,3  $\mu$ g DNS vom Plasmid pBR 322 wurden gespalten, vermischt und - wie in Abschnitt A beschrieben - mit Ligase behandelt. Dieses Präparat wurde (unter Anwendung herkömmlicher Methoden) zur Transformation des Kulturstammes HB 101 herangezogen. Selektiert wurde auf Ampizillin (ap)-Resistenz, eine durch Anwesenheit dieses Plasmids auf die Zellen übertragene Eigenschaft. Dieses Plasmid überträgt normalerweise auch Widerstandsfähigkeit gegenüber Tetrazyklin (Tc). Die Einführung von Fremd-DNS in dieses Plasmid spaltet jedoch das tet-Gen, wodurch der Anteil an tetrazyklin-sensitiven transformierten Klonen den Anteil an klonierter DNS enthaltenden Plasmiden widerspiegelt. Im vorliegenden Fall enthielten 16 % der Klone ein neues Plasmid, welches Amylaseaktivität auf *E. coli* übertrug. (Entsprechend der gegenwärtigen internationalen Nomenklatur der Plasmide werden die hier zu beschreibenden neuen Plasmide mit "pCP" und das spezifische Plasmid des vorliegenden Beispiels als "pCP 1" bezeichnet).

Aus dem eben Gesagten wird deutlich, daß das Re-Klonieren eines Gens mit demselben Enzym (in diesem Fall Hind III) ein sehr wirksames Verfahren darstellt (16 % anstatt  $1/10^5$ ).

Der plasmid-enthaltende Mikroorganismus wird als *E. coli* CL 7001 (pCP 1) bezeichnet und wurde am 12. Februar 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11570 hinterlegt.

#### D. AMPLIFIKATION UND ENZYMPRODUKTION

Die Enzymproduktion in Plasmid (pCP 1) enthaltenden Zellen wurde auf zweierlei Wegen folgendermaßen verbessert:

227656 7 - 19 -

### 1. Gesättigte Kulturen

Die Kulturen wurden bei 37 °C über Nacht auf einem Rotationsschüttler in 5-Liter-Erlenmeyerkolben (mit Einbauten versehen) mit 1 Liter Kulturmedium (LB; Hefeextrakt-Trypton) bebrütet.

### 2. Chloramphenikol-Amplifikation

Die Kulturen wurden bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler in 5-Liter-Erlenmeyerkolben (mit Einbauten versehen) mit 1 Liter Kulturmedium (LB) bis zur Erreichung einer Dichte von 0,8 (650 nm) bebrütet; sodann wurden 150 µg/ml Chloramphenikol zugesetzt. Dies verhielt die weitere Replikation der chromosomalen DNS, nicht aber die weitere Replikation des Plasmids (pCP 1), welches das Amylase-Gen enthält. Nach Amplifikation des Plasmids (bis zu 3000 Kopien) gegenüber der chromosomalen DNS wurde das Chloramphenikol entfernt, um das Wiedereinsetzen der Proteinsynthese zu ermöglichen. Im einzelnen wurden die Zellen nach der Amplifikation mittels Zentrifugation vom Medium separiert, zur Eliminierung des Chloramphenikols gewaschen und mit dem Ziel der Amylaseproduktion rekultiviert.

### E. ENZYMRÜCKGEWINNUNG

Zur Rückgewinnung der Alpha-Amylase in sehr reiner Form nutzten wir die Methode des "osmotischen Schocks". Das von H. C. Neu und L. A. Heppel in J. Biol. Chem. 240, 3685 - 3692 (1965) berichtete Verfahren wurde wie folgt gehandhabt.

Die Zellen wurden zunächst über Nacht kultiviert, danach wurden sie in 0,5 Volumenanteilen (bezogen auf die Zellkultur) einer 25 %igen Saccharoselösung suspendiert und bei 24 °C 10 min geschüttelt. Dies führte zur Plasmolyse der Zellen. Daran anschließend wurde EDTA bis zu 1 mM zugesetzt, um die Zellwände permeabel zu halten; danach wur-

de das Material bei 24 °C für weitere 10 min geschüttelt. Die Suspension wurde zentrifugiert, die Zellen wurden in kaltem Wasser (etwa 0 °C) rasch resuspendiert und bei dieser Temperatur 10 min geschüttelt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, aus der überstehenden Flüssigkeit konnten 96 % des Enzyms zurückgewonnen werden.

Zu Vergleichszwecken wurde der Donor-Mikroorganismus (*Bacillus megaterium*) kultiviert und seine enzymatische Aktivität bestimmt. Die Enzym-Menge pro ml Kulturmedium wurde mit Hilfe der DNS-Methode gemessen. Dabei ist als eine enzymatische Einheit jene Enzym-Menge definiert, die während einer zehnminütigen Inkubationszeit 1 mg reduzierenden Zucker (Bezugsbasis ist Maltose) pro Minute produziert. Als Substrat diente sehr reine Amylose.

Der Donor-Mikroorganismus erzeugte 66,0 enzymatische Einheiten pro Liter Kulturmedium. Mit *E. coli* CL 7001 (pCP 1) gesättigte Kulturen produzierten 116,6 Einheiten je Liter Kulturmedium, während *E. coli* CL 7001 (pCP 1) nach 5stündiger Kultivation (Amplifikation) mit Chloramphenikol und nach darauffolgender 15stündiger Kultivation ohne Chloramphenikol nur 84,5 Einheiten/Liter erbrachte. Dies läßt erkennen, daß die Methode der gesättigten Kultur eine gute Steigerung der Enzymproduktion zu erreichen vermag.

Das von *E. coli* CL 7001 (pCP 1) produzierte und als eine Alpha-Amylase identifizierte Enzym besitzt folgende Merkmale. Es spaltet sowohl Amylose als auch Amylopektin in Glukose, Maltose und Maltotriose - vornehmlich aber Maltose - , und es spaltet sowohl Zyklodextrin als auch Maltotriose in Glukose und Maltose. Es spaltet Pullulan in Panose und/oder Iso-Panose, eine Eigenschaft, in der es jenem Enzym ähnelt, das kürzlich von Mizuho Shimizu, Mutsuo Kanno, Masaki Tamura und Mikio Suekane in "Purification and Some Properties of a Novel Alpha-Amylase Pro-

duced by a Strain of *Thermoactinomyces vulgaris*", Agric. Biol. Chem. 42 (9), 1978, Seiten 1681 - 1688 beschrieben wurde.

Wir hielten den im vorliegenden Text als *Bacillus megaterium* bezeichneten Mikroorganismus einmal für *Bacillus circulans*.

### Beispiel II

#### Klonierung eines wärmebeständigen Alpha-Amylase-Gens

Als Donator-Mikroorganismus fungierte ein Original-Kulturstamm eines von einem Kompost isolierten *Bacillus*, der als *Bacillus coagulans* identifiziert wurde. Der *Bacillus* erzeugt eine wärmebeständige Alpha-Amylase und besitzt nachstehende mikrobiologische Merkmale.

- (1) Morphologie: Stäbchen ( $0,6 \dots 1 \mu \times 2,5 \dots 5,0 \mu$ ), beweglich, grampositiv und -negativ. Zentrale oder endständige Sporen, nicht deformierend.
- (2) Nährbouillon: gutes Wachstum.
- (3) Schrägnährgarkultur: gutes Wachstum, fadenförmige Ausbreitung, cremig weiß.
- (4) Verwertung organischer Säure - Zitrat: positiv.  
- Malonat: negativ.
- (5) Gelatine: Verflüssigung.
- (6) Produktion von Azetylmethylkarbinol (Azetain): positiv.
- (7) Orthonitrophenylgalaktosid-Hydrolyse: positiv.
- (8) Nitratreduktion: positiv, Gas kann erzeugt werden.
- (9) Katalasereaktion: positiv.
- (10) Indolproduktion: negativ.
- (11) Dekarboxylasereaktion auf - Lysin : negativ  
- Ornithin : negativ  
- Arginin : negativ.

- (12) H<sub>2</sub>S-Bildung: negativ.
- (13) Kohlenhydratverwertung: verwertet Arabinose, Galaktose, Glukose, Lävulose, Mannose, Maltose, Saccharose, Stärke, Trehalose und produziert aus ihnen Säure.
- (14) Pullulan wird auf Minimal-Medium verwertet.
- (15) Verwertung von Polyolen: Glyzerol, Sorbitol, Mannitol und Inositol werden verwertet, Adonitol und Dulzitol werden nicht verwertet.
- (16) Ureolyse: negativ.
- (17) Lezithinverwertung: negativ.
- (18) Optimale Wachstumstemperatur: 50 °C  
Maximale Wachstumstemperatur: 55...60 °C  
Minimale Wachstumstemperatur: 15...25 °C.
- (19) Sauerstoffbedarf: aerob und anaerob.

Der Kulturstamm ist am 12. Februar 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11571 hinterlegt worden.

Die DNS wurde extrahiert und der Wirkung von Eco RI; Hind III; Pst I; Sal I; Bam HI und Bgl II ausgesetzt. Lediglich Bgl II vermochte eine Vielzahl von Fragmenten in einem weiten Bereich relativer Molekülmassen entstehen zu lassen. Mit Eco RI konnten jedoch auch Fragmente hervorgerufen werden, nachdem die NaCl-Konzentration auf 50 mM vermindert worden war. Es wurde daher Eco RI zur Herstellung von Fragmenten für die Klonierung in einen Eco RI-Lambda DNS-Vektor (Lambda NM 781) eingesetzt.

#### A. RESTRIKTION VON B. COAGULANS- UND LAMBDA NM 781-DNS 'N

1,25 µg Lambda NM 781-DNS wurden mittels einer Einheit Eco RI in 25 µl des nachstehenden Puffers gespalten:  
10 mM Tris HCl (pH 7,5), 10 mM 2-Merkaptoethanol, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 100 mM NaCl.

2 µg B. coagulans-DNS wurden mit Hilfe des gleichen Enzyms

in einem ähnlichen Puffer gespalten, die NaCl-Konzentration war jedoch auf 50 mM reduziert worden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 2 Stunden hinweg, die Reaktion wurde dann durch 10-minütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde durch Elektrophorese in 1 %igen Agarose-Gelen festgestellt.

#### B. LIGATION UND RÜCKGEWINNUNG DER REKOMBINANTEN PHAGEN

Die restrigierten DNS'n wurden vermischt und unter Einsatz von zwei Einheiten T4-DNS-Ligase in einem Gemisch mit 60 mM Tris HCl (pH 8), 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM 2-Merkaptoethanol und 0,1 mM ATP verknüpft. Die Reaktion erfolgte über 10 bis 15 Stunden bei 10 °C. Nach der Ligation wurden Aliquote von 0,2 µg DNS mit ATP vermischt, um eine Endkonzentration von 10<sup>-2</sup> M zu erhalten. Diese Aliquote wurden einer in-vitro-Enkapsidation ausgesetzt und zur Infektion des Kulturstammes HB 101 von E. coli verwendet. Pro µg Lambda-DNS wurden etwa 1,6 x 10<sup>4</sup> PFU (plaquebildende Einheiten) erzielt. Einige dieser Phagen zeigten Amylaseaktivität (hinsichtlich des Nachweises von Amylaseaktivität auf Petrischalen und hinsichtlich der Rückgewinnung und Reinigung des Phagen siehe Beispiel I).

Es wurde ein ziemlich hoher Anteil von amylaseproduzierenden Phagen (1 in 400) beobachtet.

Einer von ihnen wurde selektiert und als "Lambda NM 781 Alpha Amy 1" bezeichnet. Er ist am 12. Februar 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11572 hinterlegt worden.

#### C. REKLONIERUNG DES AMYLASEGENS AUS LAMBDA NM 781 ALPHA AMY 1 IN PLASMID PBR 322

1 µg Lambda NM 781 Amy 1-DNS und eine gleiche Menge DNS vom Plasmid pBR 322 wurden unter Beibehaltung der übli-



chen Bedingungen mit Eco RI gespalten. Die Ligation und Transformation erfolgte in der in Beispiel I erläuterten Weise. Kolonien von *E. coli* HB 101 mit rekombinantem Plasmid wurden mittels ihrer Amylaseaktivität nachgewiesen. Eine derartige Kolonie wurde selektiert und als *E. coli* CL 7002 (pCP 2) bezeichnet. Sie ist am 12. Februar 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11573 hinterlegt worden.

#### D. AMPLIFIKATION DES GENPRODUKTS

Die Amplifikation des amylasecodierenden Gens von Lambda NM 781 Alpha Amy 1 sowie die Amylaseproduktion wurden folgendermaßen bewerkstelligt. Das Wirtsbakterium (*E. coli* HB 101) ließ man bei 37 °C in LB-Medium mit 2 mM MgCl<sub>2</sub> bis zur Erreichung einer optischen Dichte von 0,3 (bei 650 nm) wachsen. Dann erfolgte das Hinzufügen von Lambda NM 781 Alpha Amy 1, wobei die Zahl der Phagen mit dem Ziel der Erlangung einer Infektionsrate von etwa 1...2 berechnet wurde, daß also ein bis zwei Phagen auf eine bakterielle Zelle entfielen. Die Kultur wurde nun bei 37 °C unter starkem Rühren (Schütteln) weiter kultiviert, die optische Dichte wurde bis zum Beginn des Absinkens beobachtet. Nach Absinken der optischen Dichte unter 0,5 wurde die Kultur geerntet und auf Eis gelegt. Die Kultur wurde zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wurde auf Amylaseaktivität untersucht.

Amplifikation und Enzymproduktion mit *E. coli* CL 7002 (pCP 2) erfolgten unter Anwendung sowohl der Methode der gesättigten Kultur als auch unter Anwendung der Chloramphenikol-Amplifikation, wie sie in Beispiel I beschrieben wurden.

Die Amylaseaktivität wurde mit Hilfe der DNS-Methode sowohl im Phagenlysat als auch in jenen Kulturen von *E. coli* bestimmt, die das rekombinante Plasmid enthielten. Tabelle

I zeigt die Werte der Amylaseaktivität im Original-Kulturstamm von *B. coagulans* sowie die Aufteilung zwischen extrazellulärer und zellgebundener Aktivität. Die mit dem rekombinanten Phagen (Lambda NM 781 Alpha Amy 1) und dem das rekombinante Plasmid *E. coli* CL 7002 (pCP 2) enthaltenden Kulturstamm erzielten Aktivitäten werden ebenfalls dargestellt. Mit dem rekombinanten Phagen wurde eine Steigerung der Enzymproduktion auf das etwa Dreifache erreicht, eine sehr viel stärkere Steigerung (auf etwa das 300fache) wurde beim Plasmid beobachtet.

Im Falle des Phagen (Lambda NM 781 Alpha Amy 1) ist das gesamte Enzym durch Zell-Lysis freigesetzt und daher im Kulturmedium enthalten. Im Falle des Plasmids liegt der größte Teil des Enzyms (96 %) zellgebunden vor.

#### E. REKLONIERUNG IN EIN DERIVAT DES PHAGEN LAMBDA, DAS ZUR LYSOGENISIERUNG VON E. COLI FÄHIG IST

Zur Erläuterung der Herstellung eines Vektor-Wirt-Systems mit einem Lambda-lysogenen *E. coli* wurde folgender Versuch durchgeführt.

Verwendet wurde der Bakteriophage Lambda T4 lig. CI 857 Wam Eam Sam (Lambda NM 989). Er ist in J. Mol. Biol., Band 132 (1979), "Molecular Cloning of the DNA Ligase Gene from Bacteriophage T4. I.. Characterization of the Recombinants" von G. G. Wilson und Noreen E. Murray (Seiten 471 bis 491) und "II.. Amplification and Separation of the Gene Product" von Noreen E. Murray, S. A. Bruce und K. Murray (Seiten 493 bis 505) beschrieben.

Dieser Phage enthält das DNS-Ligasegen des Bakteriophagen T4 und vermag *E. coli* zu lyogenisieren. Er hat darüber hinaus ein thermosensitives Immunitätsgen und zwei Bernsteinmutationen im E- und im S-Gen. Die Mutation des S-Gens

**227656 7 - 26 -**

hebt die Auflösbarkeit des Bakteriums durch Infektion mit diesem Phagen auf. Der Zweck der Subklonierung bestand im Ersetzen des DNS-Ligasegens durch das Amylase codierende Gen.

Die DNS des Phagen und des Plasmids (pCP 2) wurden mit Hilfe von Eco RI geschnitten, dann wurden die Fragmente verbunden. Die aus der Ligation resultierende Phagen-DNS wurde danach in einen Organismus eingeschleust, die Plaques wurden im Plattenverfahren auf einem Kulturstamm von *E. coli* Sup E Sup F sichtbar gemacht. Die Amylaseaktivität aufweisenden Plaques wurden ausgelesen und der Phage unter Anwendung der bereits beschriebenen Techniken gereinigt.

Dieser Phage wurde dann mit herkömmlichen Techniken zur Lysogenisation eines Kulturstammes von *E. coli* C 600 (CL 1205) verwendet. Mittels Iod-Färbung wurden die lysogenen Kolonien auf einem stärkehaltigen Medium sichtbar gemacht. Dieser Kulturstamm ist von uns als *E. coli* CL 7003 (Lambda Alpha Amy 1) bezeichnet und am 6. März 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11586 hinterlegt worden.

Die Amplifikation des Genproduktes erfolgte in der nachstehenden Weise. Das Lysogen ließ man bei 32 °C in LB-Medium wachsen, bis eine optische Dichte von 0,8 bei 650 nm erreicht war. Dann wurde zentrifugiert und die Zellen in frischem LB-Medium suspendiert, welches auf 45 °C vorgewärmt worden war. Dann erfolgte eine 15minütige Inkubation der Kultur in einem 45 °C warmen Bad, um den lytischen Zyklus in Gang zu setzen (da das Immunitäts-Genprodukt wärmeempfindlich ist).

Die Inkubation wurde dann unter kräftigem Schütteln bei 37 °C 3 Stunden lang fortgesetzt. Anschließend wurde die Amylaseaktivität in der überstehenden Flüssigkeit und in den Zellen gemessen. Die Meßergebnisse sind in Tabelle I enthalten.

227656 7 - 27 -

Dieses Einzelexperiment veranschaulicht die Technik einer "Sub-sub-Klonierung" vom Plasmiden in einen neuen Lambda-Phagen.

Es sollte sich von selbst verstehen, daß die DNS von Lambda NM 781 Alpha Amy 1 genauso leicht einer Sub-Klonierung in den Phagen Lambda T4 lig. CI 857 Wam Eam Sam hätte unterzogen werden können. Andererseits hätte die Donator-DNS auch direkt in den letztgenannten Phagen kloniert werden können; eine Reihe von Variationen des als Beispiel dargestellten Verfahrens erscheint denkbar.

F. RÜCKGEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER VON LAMBDA NM 781 ALPHA AMY 1, E. COLI CL 7002 (pCP 2) UND E. COLI CL 7003 (LAMBDA ALPHA AMY 1) PRODUZIERTEN AMYLASE

Zur Enzym-Rückgewinnung wurde wie in Beispiel I die Methode des osmotischen Schocks eingesetzt. Da das Enzym aus diesem Beispiel wärmebeständig ist, könnte es darüberhinaus durch Hinzufügen von 10 mM  $\text{Ca}^{++}$  zu der wäßrigen Lösung sowie Erwärmen der Lösung auf 80 °C für 10 Minuten zusätzlich gereinigt werden. Diese Behandlung fällt die gesamten E. coli-Proteine aus und ermöglicht die Rückgewinnung der Alpha-Amylase in extrem reiner Form, es sind in der Tat keine Reste oder andere Enzyme vorhanden.

Die Besonderheit der Alpha-Amylase wurde ermittelt: sie ist auf Amylose und Stärke aktiv, Hydrolyseprodukte sind Glukose, Maltose und Maltotriose mit Spuren von Komponenten höherer relativer Molekülmassen. Auf Zyklodextrin ist dieses Enzym nicht aktiv. Ebenfalls bestimmt wurde die Wärmebeständigkeit des Enzyms, sie erwies sich als sehr hoch. Die Optimaltemperatur hinsichtlich der Aktivität mit 0,5 % Amylose liegt zwischen 80 °C und 90 °C. Mit 8 % löslicher Stärke befindet sich das Optimum um 100 °C.

227656 7 - 28 -

58 809 18

Es ist möglich, daß es sich bei dem hier als *Bacillus coagulans* bezeichneten Mikroorganismus in Wirklichkeit um *Bacillus licheniformis* handelt.

Tabelle I

Amylaseaktivität - in Einheiten<sup>x)</sup>/Liter - im Original-Kulturstamm von *B. coagulans* und in den rekombinanten Klonen von Beispiel II

	Überstehende Flüssigkeit	Periplasma	Zellen	Gesamt	Steigerung der Enzymproduktion
<i>B. coagulans</i>	42	-	-	42	1
Lambda NM 781 Alpha Amy 1	144	-	-	144	3,43 x
<i>E. coli</i> CL 7002 (pCP 2) mit cm-Amplifikation	230	-	5700 <sup>xx)</sup>	5930	141,2 x
<i>E. coli</i> CL 7002 (pCP 2) Übernacht-Kulturen	276,2	12960	232	13467	320,6 x
<i>E. coli</i> CL 7003 (Lambda Alpha Amy 1)	23	-	1162 <sup>xx)</sup>	1185	26,1 x

x) 1 Einheit ist diejenige Enzym-Menge, die 1 mg Maltose-Äquivalent pro ml pro Minute bei 50 °C ergibt, wobei 0,5 % Amylose als Substrat verwendet werden.

xx) Die Methode des osmotischen Schocks wurde nicht angewendet, dafür wurde eine Lysis vorgenommen, so daß dieser Wert die Summe der Amylaseaktivität im Periplasma und den Zellen repräsentiert.

Beispiel II A

Subklonierung des Plasmids pCP 2 in Plasmid pC 194 und  
Darstellung des neuen Plasmids in *Bacillus subtilis*

Dieses Beispiel veranschaulicht eine Technik, bei der die  
gemäß der Erfindung hergestellte rekombinante DNS in einem  
von *E. coli* verschiedenen Wirtsbakterium, nämlich in einem  
Kulturstamm von *Bacillus subtilis* exprimiert werden kann.

Das Plasmid pCP 2 aus Beispiel II enthält ein 3,31-Kb-Frag-  
ment vom *B. coagulans*-Donator. Das Plasmid ist weiterhin  
durch das Übertragen von Ampizillin- und Tetrazyklin-Resi-  
stenz gekennzeichnet, und es enthält zwei Restriktions-  
stellen jeweils für Eco RI und Hind III. Das Plasmid pCP 2  
wurde in vier Fragmente sowohl mit Eco RI als auch mit  
Hind III gespalten, mit Ligase behandelt und wie in den  
vorangegangenen Beispielen zur Transformierung von HB 101  
verwendet.

Die neugebildeten, als pCP 2,3 bezeichneten Plasmide be-  
sitzen ein 2,64-Kb-Fragment der *B. coagulans*-DNS, welches  
das Alpha-Amylase codierende Gen enthält. pCP 2,3 weist  
eine einzelne Stelle sowohl für Eco RI als auch für Hind  
III auf und überträgt sowohl Ampizillin- als auch Tetra-  
zyklin-Resistenz.

Für den nächsten Schritt wurde Plasmid pC 194 selektiert,  
welches dafür bekannt ist, daß es sich selbst in *Bacillus*  
*subtilis* replizieren kann. pC 194 überträgt Chlorampheni-  
kol-Resistenz und weist eine einzelne Hind III-Stelle auf.

Sowohl pCP 2,3 als auch pC 194 wurden mit Hind III geöff-  
net, vermischt und zwecks Bildung eines neuen, als pCH 1  
bezeichneten Plasmids verbunden. Letzteres enthält das  
Alpha-Amylase codierende Gen und besitzt sowohl Chloram-

phenikol- als auch Ampizillin-Resistenz, obgleich das Niveau der Chloramphenikol-Resistenz in *E. coli* niedrig ist. Wie vorher wurde das Produkt dazu verwendet, *E. coli* HB 101 zu transformieren.

Daraufhin wurde der als QB 1133 bezeichnete Mutantenstamm von *B. subtilis*, (Institut de Recherche en Biologie Moleculaire, Université Paris VII, Tour 43, 2 Place Jussieu, 75221 Paris Cedex 05), der keine Alpha-Amylase-Aktivität besitzt, entsprechend der von S. Chang und S. Cohen, Molec. Gen. Genet. 168, 111 bis 115 (1979) beschriebenen Technik zur Bildung von Protoplasten behandelt. Die Protoplasten wurden dann mit pCH 1 unter Verwendung des polyethylenglykol-vermittelten Transformationsverfahrens von Chang und Cohen (ibid.) transformiert.

Die Protoplasten wurden nun in einem reichen Medium über 1,5 Stunden hinweg inkubiert, um dem Plasmid im Bakterium Gelegenheit zu geben, die Chloramphenikol-Resistenz zu exprimieren.

Die Protoplasten wurden jetzt auf einem Regenerationsmedium ausgebracht, dem Chloramphenikol in einer Menge von 20  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt worden war. Nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C waren Kolonien von transformierten Zellen erschienen; mit Hilfe der Ioddampf-Färbetechnik wurden jene Kolonien ausfindig gemacht, die Alpha-Amylase-Aktivität aufwiesen. Ein als *B. subtilis* CL 8001 (pCH 1) bezeichneter Klon wurde am 13. Januar 1981 als NCIB Nr. 11629 hinterlegt. Der Originalstamm QB 1133 wurde ebenfalls am 13. Januar 1981 unter NCIB Nr. 11628 hinterlegt.

*B. subtilis* CL 8001 (pCH 1) ist nur in Anwesenheit von Chloramphenikol stabil. Es kann durch Kultivierung in einem Chloramphenikol enthaltenden Medium (20  $\mu\text{g/ml}$ ) zur Erzeugung von Alpha-Amylase verwendet werden. Die Alpha-



Amylase kann in der Kulturflüssigkeit leicht zurückgewonnen werden.

Nach einer Übernacht-Kultur in Anwesenheit von Chloramphenikol wurden folgende Mengen an produzierter Alpha-Amylase festgestellt:

Überstehende Flüssigkeit (Einh./L)	Zellen (Einh./L)	Gesamt (Einh./L)
136	14	150

### Beispiel III

#### Klonierung einer Beta-Amylase

Als Donor-Mikroorganismus fungierte ein Kulturstamm des *Bacillus cereus*, der in der GB-PS 1 466 009 beschrieben ist. Er ist am Forschungsinstitut für Fermentation in Chiba-shi (Japan) am 20. Dezember 1973 als FERM - P Nr. 2391 wie auch in der American Type Collection als ATCC Nr. 31102 am 26. Dezember 1974 hinterlegt worden. Von dem Kulturstamm ist bekannt, daß er sowohl Beta-Amylase als auch Alpha-1,6-glukosidase produziert.

#### A. KLONIERUNG DES BETA-AMYLASE-GENS IN LAMBDA NM 781

Die zur Restriktion, Ligation und Rückgewinnung der rekombinanten Phagen angewendeten Methoden entsprachen denen des Beispiels II. Die DNS (2 µg) von *B. cereus* wurde unter den normalen Bedingungen mit dem Eco RI-Restriktionsenzym behandelt. Die DNS des Phagenvektors (1,25 µg Lambda NM 781) wurde ebenfalls durch Eco RI zerschnitten. Ligation und Einschleusung erfolgten in der bereits beschriebenen Weise.

Es wurden verschiedene rekombinante Phagen mit Amylase-

227656 7 - 33 -

Aktivität aufgefunden (etwa 1 auf 500). Einer dieser Phagen (als "Lambda NM 781 Beta Amy 1" bezeichnet) wurde selektiert; er ist am 12. Februar 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11574 hinterlegt worden.

#### B. REKLONIERUNG DES BETA-AMYLASE-GENS AUS LAMBDA NM 781 BETA AMY 1 IN PLASMID PBR 322

Zur Steigerung der Enzymproduktion wurde dieser erste Beta-Amylase-Klon als Quelle betaamylasecodierender DNS verwendet, um diese durch Subklonierung in das Multikopie-Plasmid pBR 322 einzubringen.

2  $\mu$ g Lambda NM 781 Beta Amy 1-DNS und 1  $\mu$ g pBR 322 wurden mit Eco RI zerschnitten, gemischt und mit T4-Ligase behandelt. Ligation und Transformation wurden in der bereits beschriebenen Weise realisiert.

Eine unter 200 ampizillinresistenten Kolonien zeigte eine stärkeabbauende Aktivität. Eine dieser Kolonien wurde isoliert, als E. coli CL 7004 (pCP 3) bezeichnet und am 15. September 1980 als NCIB Nr. 11602 hinterlegt.

#### C. REKLONIERUNG DES BETA-AMYLASE-GENS IN EINEN ZUR LYSO- GENISATION VON E. COLI FÄHIGEN DERIVAT DES PHAGEN LAMBDA

Als Vektor wurde der in Beispiel II beschriebene thermosensitive Phage Lambda T4 lig. CI 857 Wam Eam Sam (Lambda NM 989) benutzt. Etwa 1  $\mu$ g DNS des Plasmids pCP 3 und 0,5  $\mu$ g Phagen-DNS wurden gespalten, dann wurden die Fragmente miteinander verbunden, und die resultierenden DNS-Stücke wurden in vitro übertragen. Die Phagenpartikel mit Amylase-Aktivität wurden isoliert und mit Hilfe der bereits genannten Methode zur Erlangung von lysogenen Kolonien herangezogen. Der für diesen rekombinanten Phagen lysogene Kulturstamm E. coli C 600 wurde isoliert, mit der

227656 7 - 34 -

Bezeichnung E. coli CL 7005 (Lambda Beta Amy 1) versehen und am 15. September 1980 als NCIB Nr. 11603 hinterlegt.

#### D. AMPLIFIKATION DES AMYLASEGENPRODUKTES

In allen Klonen und Subklonen wurde die Amylase-Aktivität mit Hilfe der DNS-Methode ermittelt. Die Beta-Amylase-Aktivität wurde auf Dünnschicht-Chromatogrammen durch das Vorhandensein eines einzelnen Maltoseflecks nach der Amylosedigestion bestätigt.

Die Amplifikation des Beta-Amylase-Gens in unterschiedlichen Klonen wurde in der bereits beschriebenen Weise vorgenommen. Tabelle II enthält die Angaben zur enzymatischen Aktivität im Original-Kulturstamm im Vergleich zu jener in den drei Klonen; diese Aktivität wurde entweder vom Phagen-Lysat oder mit Hilfe der in Beispiel II beschriebenen Methode des osmotischen Schocks zurückgewonnen.

Tabelle II

Extrazelluläre und zellgebundene Beta-Amylase-Aktivität in *B. cereus* und in den rekombinanten Klonen

	Extrazelluläre Aktivität Einheit/Liter	%	(1) Zellgebundene Aktivität Einheit/Liter	%	Gesamt-Aktivität Einheit/Liter
<i>B. cereus</i> (2) ATCC 31102	1420		nicht ermittelt		1420
Lambda NM 781 Beta Amy 1	80				80
<i>E. coli</i> CL 7004 (PCP 3) (3)	59	77,2	17,4	22,8	76,4
<i>E. coli</i> CL 7005 (Lambda Beta Amy 1) (4)	19	44,2	24	55,8	43

- (1) Zellgebundene Aktivität: Behandlung mit Lysozym mit Lysis der Zellen  
 (2) Die Kultur wurde bei 30 °C über Nacht angesetzt (Hefeextrakt, 1 %; Baktotrypton, 1 %; NaCl, 0,5 %)  
 (3) Übernacht-Kulturen bei 37 °C (gleiche Zusammensetzung des Kulturmediums)  
 (4) Kultivierung bei 32 °C → 45 °C → 37 °C, Messung der Aktivität in der überstehenden Flüssigkeit und in den Zellen nach der Lysis wie bei *E. coli* Lambda Alpha Amy 1 in Beispiel II.

227656 7 - 36 -

Beispiel IV

## Klonierung eines Pullulanase-Gens

Als Donator-Mikroorganismus diente ein *Klebsiella pneumoniae*, beschrieben von H. Bender in Biochem. Z. 334, Seiten 79 bis 95 (1961) und am 6. Juni 1963 beim ATCC unter Nr. 15050 hinterlegt. Es wird auch in der GB-PS 1 273 789 erwähnt.

2,25  $\mu\text{g}$  Donator-DNS wurden unter Standardbedingungen extrahiert und mit Eco RI geschnitten; 1,25  $\mu\text{g}$  Lambda NM 781-DNS wurden unter gleichen Bedingungen vom gleichen Enzym zertrennt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über drei Stunden hinweg, anschließend wurde die Reaktion durch 10minütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde nach der in Beispiel II geschilderten Weise bestimmt.

Die aufgespaltenen DNS'n wurden verbunden, zurückgewonnen und - alles wie in Beispiel II - zur Infektion des Kulturstammes HB 101 von *E. coli* verwendet. Pro  $\mu\text{g}$  Lambda-DNS wurden etwa  $2 \times 10^5$  plaquebildende Einheiten erzielt.

Nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C auf BBL Tryptikase plus 0,25 % Pullulan enthaltenden Platten zeigten einige Plaques Pullulanase-Aktivität dergestalt, daß sie von undurchsichtigen, für "überwuchernde" Bakterien charakteristischen Ringen umgeben waren. Der Anteil pullulanaseproduzierender Phagen lag im Bereich von 1 : 2500. Einer von ihnen wurde selektiert, von uns als "Lambda NM 781 Pul 1" bezeichnet und am 9. April 1980 beim NCIB als NCIB Nr. 11593 hinterlegt.

Die Pullulanase-Aktivität wurde mit Hilfe der DNS-Methode ermittelt, das Produkt der Pullulan-Hydrolyse durch die Phagenlysate wurde mittels Dünnschicht-Chromatographie

als Maltotriose identifiziert.

Lambda NM 781 Pul 1 enthält ein großes DNS-Fragment (von *Klebsiella pneumoniae*) von 13,5 Kb; dieses Fragment wurde durch Eco RI erneut zertrennt, was zu zwei Fragmenten von 6,1 Kb bzw. 7,4 Kb führte. Das Subfragment mit 6,1 Kb wurde dann in Lambda NM 781 rekloniert; es erwies sich als Träger des Pullulanase-Gens. Dieser neue rekombinante Phage erhielt die Bezeichnung NM 781 Pul 2; er wurde am 15. September 1980 als NCIB Nr. 11604 hinterlegt.

Das 6,1-Kb-Subfragment wurde darüberhinaus einer Subklonierung in das Multikopie-Plasmid pACYC 184 (einem Derivat von pBR 322 mit dem Tc<sup>R</sup>-Gen des letzteren und einem Cm<sup>R</sup>-Gen mit einer Eco RI-Stelle) unterzogen. Der so erhaltene neue Klon heißt *E. coli* CL 7006 (pCP 4); er wurde am 15. September 1980 als NCIB Nr. 11605 hinterlegt.

Ein dritter Subklon wurde durch Einlagern des 6,1-Kb-Fragments in den Phagen Lambda NM 989 nach der in Beispiel II beschriebenen Weise hergestellt. Dieser Klon wird als *E. coli* CL 7007 (Lambda Pul 2) bezeichnet; er wurde am 15. September 1980 als NCIB Nr. 11606 hinterlegt.

Der Grad der Expression und der Amplifikation der Pullulanase wurde in allen Klonen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich wird, wird die Pullulanase-Aktivität durch Maltose induziert, dem LB-Medium waren 0,04 % Maltose zugesetzt worden. Darüber hinaus war eine Triton X 100 - Behandlung der Membranfraktion erforderlich, um die Pullulanase zurückzugewinnen; dies deutet darauf hin, daß die Aktivität in den Membranen lokalisiert ist.

Tabelle III

Expression von Klebsiella-Pullulanase in E. coli-Klonen. Die Aktivität ist in Einheiten Maltose-Äquivalent für eine 1-Liter-Kultur ausgedrückt.

	überstehende Flüssigkeit	Membranen	Gesamt	Steigerung der Enzymproduktion
Klebsiella pneumonia + Maltose	24	3,5	27,5	1
Lambda NM 781 Pul 1	0,76	2,6	3,86	0,14
Lambda NM 781 Pul 1 + Maltose	2,2	9,84	12,04	0,44
Lambda NM 781 Pul 2	9,6	23,8	32,9	1,19 x
Lambda NM 781 Pul 2 + Maltose	8,6	26,7	35,3	1,28 x
x E. coli CL 7006 (pCP 4)	nicht ermittelt	3,4	3,4	0,123
x E. coli CL 7006 (pCP 4) + Maltose	nicht ermittelt	114	114	4,14 x
xx E. coli CL 7007 (Lambda Pul 2) + Maltose	47	93,5	140,5	5,13 x

x Übernacht-Kulturen

xx Kultivierung bei 32 °C 45 °C 37 °C, Messung der Aktivität in der überstehenden Flüssigkeit und in den Zellen nach der Lysis wie bei E. coli Lambda Alpha Amy 1 in Beispiel II.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung der rekombinanten DNS durch Spalten und Verbindungen der DNS's eines bakteriellen Donatormikroorganismus, der in der Lage ist, Amylase zu produzieren und eines Vektors, Einführen in einen geeigneten Wirt, Screening und Selektion der erhaltenen Klone auf der Basis eines Amylase codierenden Gens, gekennzeichnet dadurch, daß als Vektor ein Plasmid oder die DNS eines Derivates des Phagen Lambda verwendet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet durch den zusätzlichen Schritt des Extrahierens und Schneidens der DNS eines selektierten Klon, Subklonierung in einen anderen Vektor und nochmaligem Durchprüfen und Selektieren auf der Basis eines Amylase codierenden Gens, wobei der andere Vektor ein Plasmid oder die DNS eines anderen Derivates des Phagen Lambda ist, und daß der Subklonierung gegebenenfalls eine oder mehrere weitere Subklonierungen folgen können.
3. Verfahren nach den Punkten 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Durchprüfen (screening) durchgeführt wird, indem die Klone auf einem stärkehaltigen Kulturmedium ausplattiert werden und das Kulturmedium mit Jod eingefärbt wird, indem man die Kolonien Joddämpfen aussetzt.
4. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Amylase codierende Gen ein Pullulanase codierendes Gen ist, und das Durchprüfen derart erfolgt, daß die Klone auf einem BBL Trypticasemedium plattiert werden, das Pullulan enthält, wobei die positiven Klone durch sie umgebende, undurchsichtige Ringe erkennbar werden.



227656 7 -40-  
-2-

5. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß der Donatororganismus *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus* oder *Klebsiella pneumoniae* ist.
6. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß der Donatororganismus *Bacillus megaterium* NCIB Nr. 11568, *Bacillus coagulans* NCIB Nr. 11571, *Bacillus cereus* ATCC Nr. 31102 oder *Klebsiella pneumoniae* ATCC Nr. 15050 ist.
7. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß der Phage, an den der Donator gebunden ist, Lambda NM 590 oder Lambda NM 781 ist.
8. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß die DNS der selektierten Klone mit einem Plasmid verbunden ist und das Plasmid pBR 322, pACYC 184 oder pC 194 ist.
9. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß die DNS der selektierten Klone mit der DNS eines anderen Derivates des Phagen Lambda verbunden ist und der Phage Lambda NM 989 ist.
10. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der bakterielle Donatormikroorganismus ein *Bacillus*-Stamm ist.
11. Verfahren nach den Punkten 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß es sich um die Phagen Lambda NM 590 Amy 1, NCIB Nr. 11569; Lambda NM 781 alpha Amy 1, NCIB Nr. 11572; Lambda NM 781 beta Amy 1, NCIB Nr. 11574; Lambda NM 781 Pul 1, NCIB Nr. 11593, Lambda NM 781 Pul 2, NCIB Nr. 11604 sowie Varianten und Mutanten davon handelt.