



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

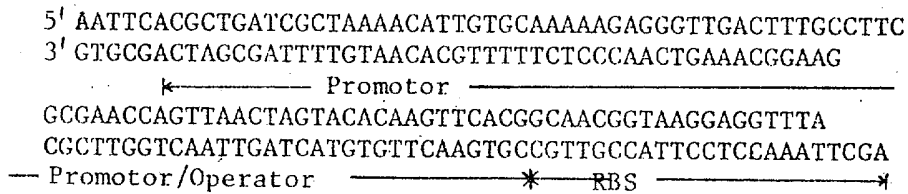
- (21) 3935004/28-13 (62) 3681952/28-13
(22) 02.08.85
(23) 23.12.83
(31) P 32479220
(32) 24.12.82
(33) DE
(46) 15.08.88. Бюл. № 30
(71) Берингер Ингельгейм Интернациональ ГмбХ (DE)
(72) Марк-Брусс Дворкин (US), Эва Дворкин-Раствль, Гюнтер Адольф (AT), Норберт Гауель (DE), Петер Мейндль, Петер Светлы и Рудольф Хауптманн (AT)
(53) 575.224.2; 577.2 (048) (088.8)
(56) Goeddel D.V. et.al. Human leukocyte interferon produced by E.coli is biologically active. Nature, 1980, 287, p. 411-416.
(54) СПОСОБ КОНСТРУИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК pER-33, КОДИ-

РУЮЩЕЙ ЗРЕЛЫЙ α -ИНТЕРФЕРОН ЧЕЛОВЕКА
(57) Изобретение относится к области генетической инженерии, в частности к способу получения плазмиды, пригодной для получения интерферона типа α . Предлагаемый способ получения рекомбинантной плазмиды заключается в том, что в плазмиду pER 103 вводят промотор-операторный RBS-фрагмент, после обработки Hind III эндонуклеазой и фосфатазой данную плазмидную ДНК через линкерную последовательность легируют с IFN- α -последовательностью, причем в полученную таким образом плазмиду через EcoRI-Ваш HI линкер вводят pac-Lokus, выделенный EcoRI эндонуклеазой из плазмиды pPM 31, или же ДНК фрагмент длиной ~ 130 вп, полученный путем обработки плазмиды pER 33 ферментами EcoRI и Bam HI.

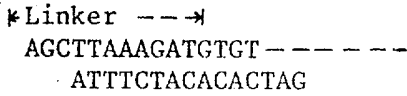
Изобретение относится к генетической инженерии, в частности к способу получения плазмиды, пригодной для получения интерферона типа α .

Предлагаемый способ получения плазмиды, кодирующей зрелый α -интерферон

человека, заключается в том, что плазмиду pER 103, которую получают путем расщепления pBR322 эндонуклеазами с последующим удалением Eco RI-Hind III-фрагмента длиной 29 bp и введением ДНК-последовательности формулы



в результате реакции лигирования после его обработки Hind III и фосфатозой сшивают с линкерной последовательностью формулы



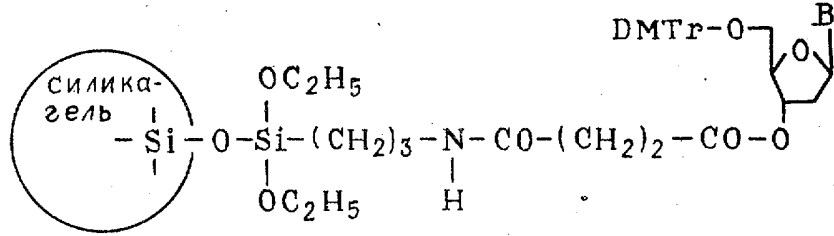
к которой присоединяют кодирующую IEN- α -последовательность, причем дополнительно в полученную таким образом плазмиду через Eco RI-BamHI-линкер вводят par-Lokus, выделенный Eco RI эндонуклеазой из плазмиды pPM 31, или же ДНК-фрагмент длиной примерно 1300 bp, полученный путем обработки плазмиды pER33 ферментами Eco RI и Bam HI.

Конечную плазмиду трансформируют в Escherichia coli HB 101, и отбирают

нужные клоны, трансформированные плазмидой и культивируют их известными методами.

Изображение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Функционализацию полимерного материала-носителя осуществляют по известным способам. В качестве материала-носителя служит HPLC-силикагель (Macherey 5Nagel), размер зерен 20 мкм, размер пор 200 Å). Его дериватизируют методом Mateucci и Caruthers, за исключением того, что стадию сукцинирования осуществляют с помощью ангидрида янтарной кислоты в безводном пиридине. Защищенные нуклеозиды таким образом связывают ковалентно с силикагелем соответствующей формуле



Удельная нагрузка составляет 68-104 мкмоль нуклеозида на 1 г материала-носителя.

Пример 2. 5'-Диметокситригил-дезокситимидин-3'-хлорметоксифосфит.

Полностью защищенные нуклеозид-3'-хлорметоксифосфиты синтезируют по известным способам, 544,6 мг (1,0 ммоль) 5'-диметокситригил-тимидина (DMTrTd) растворяют в 1,0 мл абсолютного ТГФ и этот раствор при -78°C в течение 15 мин в атмосфере аргона прикапывают к перемешиваемому раствору 0,9 мкмоль метилдихлорфосфита в 0,5 мл абсолютного пиридина и 2,0 мл абсолютного

ТГФ. Через 10 мин реакционный раствор нагревают до комнатной температуры и центрифугируют. Надсадочную жидкость переносят с помощью пипетки в сухую заполненную аргоном колбу со шлифом (25 мл). При комнатной температуре растворитель отсасывают в вакууме, затем добавляют по 0,5 мл толуола и ТГФ и снова выпаривают, причем в качестве продукта остается бесцветное вспененное твердое вещество. Этот продукт не анализируют на его чистоту, а растворяют в 10,0 мл абсолютного пиридина и этот раствор хранят под аргоном при -20°C вплоть

до дальнейшего применения (максимально в течение одной недели).

Пример 3. 5'-Диметокситритил-N²-изобутирил-дезоксигуанозин-3'-хлорметоксифосфит.

Аналогично примеру 2 получают раствор этого нуклеозидфосфорохлоридита в 10,0 мл пиридина из 640,0 мг (1,0 ммоль) 5'-диметокситритил-N²-изобутил-дезоксигуанозина.

Пример 4. 5'-Диметокситритил-N-бензоил-дезоксцитидин-3'-хлорметоксифосфит.

Аналогично примеру 2 получают раствор этого нуклеозидфосфорохлоридита в 10,0 мл пиридина из 683,7 мг (1,0 ммоль) 5'-диметокситритил-N⁴-бензоил-дезоксцитидина.

Пример 5. 5'-Диметокситритил-N⁶-бензоил-дезоксаденозин-3'-хлорметоксифосфит.

Аналогично примеру 2 получают раствор этого нуклеозидфосфорохлоридита в 10,0 мл пиридина из 657,7 мг (1,0 ммоль) 5'-диметокситритил-N⁶-бензоил-дезоксаденозина.

Пример 6. Синтез d-ТССТТА.

50 мг (5 мкмоль) содержащего DMTrdA⁶² полимерного носителя (см. пример 1) вносят в стеклянную фритту. Соответственно следующему шагу затем добавляют различные растворители и растворы реактивов; носитель в ней кратковременно встряхивают и раствор после желательного взаимодействия снова удаляют тем, что с помощью тока аргона его вытесняют вверх через фритту.

а) Отщепляют DMTr-группы с помощью 3 мл раствора из 70 г бромиды цинка, 500 мл нитрометана и 5 мл воды, время реакции 10 мин;

б) осуществляют 4 промывки по 3 мл

смесью н-бутанол-дутидин-ТГФ (4:1:5);

в) осуществляют 4 промывки по 4 мл абсолютным пиридином;

г) неконденсирование ближайшей нуклеотидной единицы: 1 мл пиридинового раствора 5'-диметокситритил-дезокситимидин-3'-хлорметоксифосфита (пример 5) (примерно 100 мкмоль) под аргоном добавляют в фритту к полимерному носителю и его встряхивают в растворе, время реакции составляет 10 мин;

д) осуществляют 3 промывки по 3 мл абсолютным пиридином;

е) осуществляют окисление сложным триэфиром фосфористой кислоты с помощью 100 мг иода, растворенного в 3 мл смеси из ТГФ, лугидина и воды (2:2:1), время реакции 7 мин;

ж) осуществляют 3 промывки по 4 мл ТГФ;

з) ацетируют непревращенные 5'-ОН-группы с помощью раствора 150 мг 4-диметиламинопиридина, 0,3 мл коллидина, 0,25 мл ацетангидрида и 2,5 мл ТГФ, время реакции 5 мин;

и) осуществляют 4 промывки по 3 мл нитрометаном.

Цикл от а) до и) повторяют теперь четыре раза, причем на стадии г) используется необходимый для последовательности нуклеотидный структурный элемент.

После приконденсирования последнего нуклеотидного структурного элемента материал носителя высушивают в вакууме масляного насоса, пробу взвешивают с точностью до 1 мг и смешивают с 10,0 мл 0,1 М раствора толуолсульфокислоты в ацетонитриле. Путем происходящего при этом отщеплении диметокситритил-катиона получают оранжево-красный окрашенный раствор, абсорбция которого измеряется при 498 нм. По формуле

$$\text{Нагрузка (мкмоль/г)} = \frac{\text{адсорбция}^{498}}{\text{вес носителя (мг)}} \cdot (\text{фактор разбавления}) \cdot 14,3$$

можно рассчитать загрузку материала-носителя диметокситритильными защитными группами. Получают 43 мкмоль/г. Это соответствует среднему выходу 85% на стадию конденсации.

Отщепление метильных остатков от триэфирных групп фосфорной кислоты.

Материал носителя в течение 45 мин встряхивают в 4 мл раствора тиофенола, триэтиламина и диоксана (1:1:2),

затем промывают метанолом, после этого эфиром.

Материал носителя в течение 14 ч нагревают с 10 мл концентрированного аммиака при 50°C, водный раствор затем отсасывают и фильтрат концентрируют в вакууме примерно до 2 мл.

Полученный сырой продукт, содержащий на 5'-конце диметокситритильную группу, подвергается воздействию об-

ратимой фазы HPLC. Колонна μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант: 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер с pH 7 с 25% ацетонитрила; истечение 2 мл/мин; время удержания 14 мин. Собранные фракции после элюирования концентрируют примерно до объема 1 мл, смешивают с 10 мл 80%-ной уксусной кислоты и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Затем концентрируют в вакууме при 50°C досуха, остаток растворяют в 25 мл воды и отщепленный диметокситританол экстрагируют 3 раза по 15 мл эфиром. Водную фазу снова концентрируют досуха, остаток растворяют в 2,5 мл воды, обес-
 5 колливают на биогеле Р 2 (колонна: 60 x 1,7 см) и диофилизируют.

В качестве контроля чистоты служит аналитическая HPLC-диаграмма. Колонна 300 x 3,9 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюанты: 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер с pH 7 с 12% ацетонитрила; истечение 1,5 мл/мин, время удерживания 3,7 мин.

Пример 7. Синтез d-TAAGGAGGTTTA.

Получают аналогично примеру 6 исходя из 300 мг (30 мкмоль) DMTrdA^{bz}-P.

HPLC-диаграмма продукта: колонна 300 x 3,9 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер с pH 7 с 12% ацетонитрила; истечение 1,5 мл/мин, время удерживания 4,4 мин.

Пример 8. Синтез d-ACCTTAAACC.

Получают аналогично примеру 6 исходя из 200 мг (16 мкмоль) DMTrdC^{bz}-P.

HPLC-диаграмма продукта: колонна 300 x 3,9 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер с pH 7 с 12% ацетонитрила; истечение 1,5 мл/мин, время удерживания 3,4 мин.

Пример 9. Синтез d-CATCTTTA.

Получают аналогично примеру 6 исходя из 150 мг (1,32 мкмоль) DMTrdA^{bz}-P.

HPLC-диаграмма продукта: колонна 300 x 7,8 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант: 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер с pH 7 с 20% ацетонитрила; истечение 1,5 мл/мин; время удерживания 7,7 мин.

Пример 10. Синтез d-AGCTTAAAGATG.

Получают аналогично примеру 6 исходя из 200 мг (16,2 мкмоль) DMTrdG^{bu}-P.

HPLC-диаграмма продукта: колонна 300 x 7,8 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер, pH 7 с 26% ацетонитрила; истечение 1,5 мл/мин; время удерживания 5,2 мин.

Пример 11. Синтез d-TGTGATCTGCCCTCA.

Получают аналогично примеру 6 исходя из 250 мг (22 мкмоль) DMTrdA^{bz}-P.

HPLC-диаграмма продукта: колонна 300 x 7,8 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер, pH 7 с 25% ацетонитрила; истечение 1,5 мл/мин; время удерживания 6,1 мин.

Пример 12. Синтез d-CAGATCACA.

Получают аналогично примеру 6 исходя из 150 мг (13,2 мкмоль) DMTrdA^{bz}-P.

HPLC-диаграмма продукта: колонна 300 x 7,8 мм, μ -Bondapak C_{18} фирмы Waters; элюант 0,1 М триэтиламмонийацетатный буфер с pH 7 с 20% ацетонитрила; истечение 0,2 мл/мин; время удерживания 5,2 мин.

Анализ последовательностей синтетически полученных олигодеоксинуклеотидов осуществляют после того, как они встроены в интерферонпродуцирующую плазмиду pER 33. С помощью этого анализа одновременно подтверждают правильность последовательности оснований в олигооксинуклеотидах.

Пример 13. Плазида pBP 101, которая содержит примерно фрагмент размером 1000 bp, кодирующий триптофановый оперон *Serratia marcescens*, представляет собой исходный материал для выделения промотор-операторной области. Эта регуляторная область находится внутри Eco RI-Nae III-фрагмента длиной 90 bp, в котором промотор ориентирован в направлении Eco RI → Nae III.

Примерно 25 мг плазмиды pBP 101 переваривают рестрикционной эндонуклеазой Eco RI, два образующихся фрагмента отделяют друг от друга путем электрофореза (1,4% агарозы) и фрагмент длиной 200 bp электрофоретически элюируют из геля. Этот фрагмент затем переваривают с помощью Nae III, оба продукта переваривания разделяют на 6%-ном полиакриламидном геле и фрагмент длиной 90 bp (промотор-оператор) снова выделяют из геля.

RBS составляют из 3-х синтетических олигонуклеотидов: 6-мера 5'-TCCTTA, 10-мера 5'-AGCTTAAACC и 12-мера 5'-

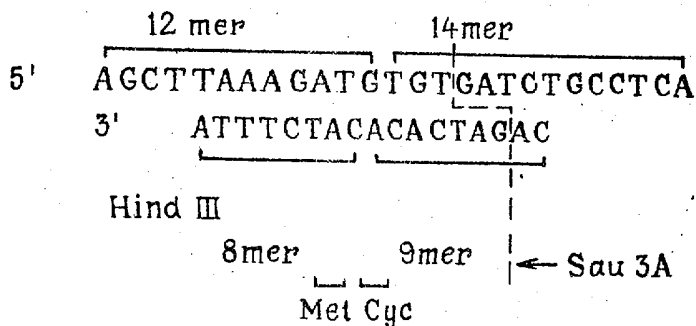
(pER 103) подвергают последовательно-му анализу и его положение устанавли-вают в pBR 322. Последовательный ана-лиз проводят по методу Махам и Gil-berth в направлении от Eco RI-сайта в направлении Hind III-сайта (и сверх него), как также от Hind-III-сайта в направлении Eco RI-сайта (и сверх него).

Плазмида pER 103 таким образом со-держит промотор-операторную область триптофанового оперона *Serratia marcescens* в комбинации с синтетической RBS. Новая плазмида промотирует тран-скрипцию генов, которые встраиваются в его Hind III-сайт, и позволяет осуще-ствлять эффективную трансляцию этих продуктов транскрипции.

П р и м е р 14. Примерно 1 мкг Pst I-вставки 1F17 переваривают с по-мощью Sau 3A и из 6%-ного полиакрил-амидного геля выделяют фрагмент дли-ной 177 bp, который простирается от Sau 3A-сайта на NH₂-концевом цистеи-новом кодоне вплоть до ближайшего Sau 3A-сайта и содержит Ava II-сайт. Его обрабатывают 1 единицей щелочной фосфатазы и после удаления фосфатазы благодаря экстракции фенолом и эфир-ром осаждают с помощью этанола. Фраг-мент затем обрабатывают Ava II, бла-годаря чему получают желательный фрагмент 34 bp Sau 3A-Ava II и 143 bp-фрагмент.

Параллельно этому из плазмиды 1F17 препарируют интерферонспецифический Ava II-фрагмент размером 646 bp, ко-торый простирается от Ava II-сайта внутри Sau 3A-фрагмента размером 177 bp за концевой кодон. Примерно 0,5 мкг этого Ava II-фрагмента раз-мером 646 bp вместе со смесью из 34 bp и 143 bp Sau 3A-Ava II-фрагментов инкубируют с ДНК-лига-зой. Образующиеся благодаря этому фрагменты Ava II, которые ковалентно связаны, фланкируют Ava II-Sau 3A-фрагментами. Как только Ava II-Sau 3A-фрагмент лигируется с фрагментом Ava II, на этом месте не может более происходить никаких других лигирова-ний, так как Sau 3A-концы дефосфори-руются. После лигирования осущест-вляют нагревание в течение 10 мин при 70°C, чтобы инактивировать фермент, затем добавляют 5 мкмоль ДТТ и 0,25 мкмоль АТР и дефосфорированные Sau 3A-концы снова кинезируют. Реак-ционную смесь разделяют на 6%-ном по-лиакриламидном геле и молекулы в об-ласти 700-800 bp (646 bp Ava II-фраг-мент фланкирован двумя Ava II-Sau 3A-фрагментами) и в области 1300-1500 bp (два друг с другом лигирован-ные 646 bp Ava II-фрагменты фланкиро-ваны Ava II-Sau 3A-фрагментами) элю-ируют.

Получение олигонуклеотидного ком-плекса формулы



Получают 4 синтетических олигонук-леотида, а именно 14-мер 5' - TGATCTGCCTCA, 12-мер 5' - AGCTTAAAGATG, 9-мер 5' - CAGATCACA и 8-мер 5' - CATCTTA.

По 250 пмоль 8-мера, 9-мера и 14-мера фосфорилируют после реакции киназу инактивируют путем нагревания при 95°C, добавляют 250 пмоль неки-назированного 12-мера и олигонуклео-тидную смесь медленно (примерно

в течение 3 ч) охлаждают до 35°C, чтобы сделать возможной гибри-дизацию олигонуклеотидов. Затем пос-ле добавки 5 мкмоль ДТТ и 0,25 мкмоль АТР олигонуклеотиды лигируют друг с другом. Отсутствие фосфатного остатка на 5'-конце 12-мера предотвращает образование димеров; выступающий ко-нец 14-мера не самокомплементарен, он не может приводить к димеризации.

Аликвотную часть (25 пмоль) лигированного олигонуклеотидного комплекса переваривают с помощью 80 единиц *Sau* 3A, чтобы получить подходящий интерфероногену *Sau* 3A-конец. Затем пробу нагревают в течение 10 мин при 75°C, экстрагируют фенолом и осаждают этанолом. Таким образом, последовательный фрагмент, который связывает интерфероноген с *Hind* III-срезанным pER 103 согласно изобретению, готов.

Связывание интерфероногена и олигонуклеотидного комплекса, лигированное в pER 103.

Изолированные фрагменты интерферона, которые представляют собой примерно 1 пмоль молекул, связывают с *Sau* 3A-разрезанным олигонуклеотидным комплексом (примерно 25 пмоль) путем лигирования когазивных *Sau* 3A-концов. Снова отсутствие фосфатного остатка на *Hind* III-конце олигонуклеотидного комплекса (12-мер) предотвращает возникновение мультимеров. Образуются молекулы интерфероногена, которые с обеих сторон олигонуклеотидного комплекса фланкированы свободными *Hind* III-концами. После денатурирования при нагревании лигазы и добавки 5 мкмоль ДТТ и 0,25 мкмоль АТФ эти концы фосфорилируют, затем осуществляют осаждение с помощью изопропанола, чтобы отделить также образовавшиеся в реакции лигирования димеры олигонуклеотидного комплекса. После этого конструкцию лигируют с помощью 0,05 мкг *Hind* III, обработанной эндонуклеазой и фосфатазой плазмиды pER 103. Обработка фосфатазой *Hind* III-разрезанной плазмиды уменьшает его рециркуляцию в реакции лигирования. Таким образом, смесь плазмиды готова, она содержит до 50% продуцирующих интерферон плазмид (а именно тех плазмид, которые получают из 34 bp *Sau* 3A-Ava II-фрагмента в лигировании с помощью 646 bp Ava II-фрагмента на начале гена.

Трансформация *Escherichia coli* HB 101 и анализ трансформации в отношении продуцирования интерферона.

Полученными плазмидами трансформируют штамм *E. coli* HB 101. Примерно 20% полученных трансформантов имеют вставки, из которых многие исследуются на экспрессию интерферона. Для этого 100 мл бактериальной культуры в M9 минимальной среде, в которую до-

бавлены все аминокислоты, кроме триптофана (20 мкг/мл на аминокислоту), а также тиамин (1 мкг/мл), глюкоза (0,2%) и индуктор триптофаноноперона индол-(3)-акриловая кислота (IAA, 20 мкг/мл, выращивают до оптической плотности 0,6-0,8. Бактерии пеллетировывают благодаря центрифугированию в течение 10 мин при числе оборотов 7000 в 1 мин, промывают 1 раз 50 мл трис-HCl, pH 8, 30 мкмоль NaCl и суспендируют в 1,5 мл такого же буфера. После инкубации с 1 мг/мл лизозима в течение 30 мин на льду бактерии пять раз замораживают и оттаивают и затем удаляют фрагменты клеток путем центрифугирования в течение 1 ч при 40000 об/мин. Надосадочную жидкость стерильно отфильтровывают и испытывают в тесте по уменьшению пятен с V3-клетками и вирусом Vesicular Stomatitis на интерферонную активность. Примерно половина всех клонов (со вставками) обладает значительной интерферонной экспрессией: 2×10^8 единиц (международные стандартные единицы) на 1 л культуры.

Выбирают один из этих продуцирующих интерферон клонов (pER 33) и от промотор-операторной области подвергают последовательному анализу далее вплоть до интерфероногена, чтобы установить правильность сконструированного плазмиды. Последовательный анализ снова осуществляют по Махам и Gilbert от радиоактивно маркированного на 3'-конце Eco RI-сайта в направлении интерферонгена.

Плазмиды pER 103 содержат промотор-операторную последовательность триптофаноноперона *Serratia marcescens* в комбинации с синтетической последовательностью рибосомного связывания. Встроенные в плазмиду pER 103 пригодным образом гены показывают высокие значения экспрессии. Плазмиды pER 103 штамм бактерий в *E. coli* K₁₂, HB 101 сдана на хранение в немецкое собрание микроорганизмов, Grisebachstraße 8, 3400 Геттинген/ФРГ, под номером DSM 2773 от 27 октября 1983 г., согласно Будапештскому договору.

Пример 15. 2 мкг pER 33 разрезают с помощью рестрикционной системы Eco RI и Bam HI, благодаря чему образуются два фрагмента длиной примерно 1300 bp и примерно 4000 bp. Эти фрагменты разделяют электрофоретичес-

ки на 1,2%-ном агарозном геле. Более короткий фрагмент выделяют из геля путем электроэлюирования. Концы этих ДНК благодаря добавке по 1,25 нмоль dATP, dGTP, dCTP и dTTP, а также 2-х единиц Klenow-фрагмента ДНК-полимеразы 1 переводят в тупые концы. ДНК очищают путем экстракции фенолом и осаждения из этанольного раствора и затем растворяют в 15 мкл H₂O.

Примерно 15 пмоль Eco RI-линкера фосфорилируют по 5'-концам путем добавки γ -³²P-ATP и T4-полинуклеотидкиназы в 5 мл реакционного раствора. После инактивации нагреванием киназы добавляют 5 пмоль ATP и 0,1 единицы T4-лигазы и инкубируют 16 ч при 14°C. Реакционный продукт очищают путем осаждения изопропанолом от низкомолекулярных веществ.

ДНК затем разрезают с помощью 20 единиц рестрикционного фермента Eco RI, еще раз очищают путем осаждения изопропанолом и растворяют в 10 мкл воды.

Примерно 2 мкг pER 33 обрабатывают рестрикционным ферментом Eco RI. Затем добавляют щелочную фосфатазу, чтобы удалить 5'-фосфатные остатки длиной примерно 5300 бп, линейную ДНК путем электрофореза в 1,2%-ном геле агарозы и электроэлюирования очищают от остаточной не разрезанной pER 33. ДНК экстрагируют фенолом и эфиром, осаждают из этанольного раствора и растворяют в 10 мкл воды.

4 мкл снабженного Eco RI-линкерами ДНК-фрагмента, который содержит IFNaA-ген плюс регуляторные элементы лигируют друг с другом с 0,5 мкл обработанной Eco RI и дефосфорилированной pER 33 плазмидой в 20 мкл реакционного раствора с помощью 0,1 единицы T4-лигазы. После инкубации в течение 16 ч при 14°C фермент разлагают путем нагревания при 68°C.

Escherichia coli HB 101 трансформируют аналогично примеру 1. Два из таким образом полученных клонов испытывают аналогично примеру 2 на экспрессию интерферона посредством теста на уменьшение пятна. В то время как клон pER 33 содержит до 200 x 10⁶ единиц IFN на 1 л культуры, с помощью одного из новых клонов pER 21/1 получают более чем 300 x 10⁶ единиц на 1 л культуры.

Плазмиду pER 21/1 выделяют в большом количестве и анализируют с помощью переваривания рестрикционными ферментами с помощью Hind III. Так как введенная в pER 33 вместо Eco RI ДНК имеет два идентичных Eco RI-сайта, то возможны две ориентации этой ДНК и pER 21/1. Рестрикционное ферментное переваривание плазмиды pER 21/1 Hind III 21/1 с параллельно направленными интерферонгенами должно давать фрагменты примерной величины 4100, 950 (2 фрагмента) и 450 бп. Когда оба гена ориентированы противоположно, размеры фрагментов следующие 4350, 950 (2 фрагмента) и 200 бп. Переваривание примерно 2 мкг pER 21/1 с помощью рестрикционной системы Hind III и последующий электрофорез в 1,4%-ном геле агарозы дают фрагменты примерной величины 4100, 950 и 450 бп. Поэтому оба IFNaA-гена ориентированы параллельно друг другу.

Пример 16. Примерно 200 пмоль Eco RI линкера (New England Biolabs, Inc.) в 20 мкл реакционного раствора фосфорилируют на концах с помощью 9 единиц T4-полинуклеотидкиназы и 10 пмоль ATP, затем фермента инактивируют при нагревании.

8 мкг плазмиды pPM 31 разрезают с помощью эндонуклеазы Ava.1. Концы этой разрезанной плазмиды путем добавки по 5 пмоль dATP, dGTP, dTTP, а также 4 единиц фермента Klenow-фрагмента полимеразы 1 переводят в тупые концы. ДНК очищают путем экстракции фенолом и осаждения из этанольного раствора и растворяют в 40 мкл воды.

Eco RI линкер вместе с обладающей линеоризованными и тупыми концами ДНК в 70 мкл реакционного раствора с 6 пмоль ATP и 1 единицей T4-лигазы обрабатывают 16 ч при 14°C. После инактивации фермента при нагревании в растворе устанавливают pH 7,6 с помощью 50 ммоль NaCl и 50 мкмоль трис-Cl и ДНК обрабатывают 300 единицами Eco RI. Спустя 2 ч времени инкубации рестрикционный фермент денатурируют при нагревании и ДНК отделяют электрофоретически в 1,4%-ном геле агарозы. Содержащий *pac*-Lokus отрезок ДНК примерно длиной 400 бп электроэлюируют из геля, очищают путем экстракции фенолом и осаждения из этанольного раствора и растворяют

в 50 мкл воды. Этот отрезок ДНК имеет специфические выступы на своих концах Eco RI.

Примерно 2 мкг pER 33 обрабатывают с помощью рестрикционного фермента Eco RI. Затем добавляют щелочную фосфатазу, чтобы удалить 5'-фосфатные остатки. Линейную DNS длиной 5300 bp очищают путем электрофореза в 1,2%-ном геле агарозы и электроэлюирования от остаточного не разрезанного pER 33.

ДНК-раствор экстрагируют фенолом и эфиром, осаждают из этанольного раствора и растворяют в 50 мкл воды.

1 мкл разрезанной плазмидной ДНК лигируют с 1 мкл par-Lokus ДНК в 20 мкл реакционного раствора с помощью 0,1 единицы T4-лигазы. После инкубации в течение 16 ч при 14°C фермент инактивируют нагреванием. *Escherichia coli* HB 101 трансформируют аналогично примеру 1. Получают примерно 50 колоний. Из 10 этих колоний выделяют незначительное количество плазмиды ДНК и разрезают с помощью рестрикционного фермента Pst I. Из анализа путем электрофореза в агарозе следует, что все плазмиды содержат примерно 400 bp длиной par-Lokus. Выбирают один из этих плазмид и обозначают par pER 33.

Аналогично примеру 2 культивируют бактерии, которые содержат либо pER, либо par pER 33, и затем испытывают в тесте с уменьшением пятна на содержание интерферона. Оба штамма показывают примерно один и тот же уровень экспрессии интерферона.

В опыте, осуществляемом длительное время, который распространяется на 120 генераций бактерий, исследуют стабильность плазмидов pER 33 и par pER 33 и *Escherichia coli* HB 101 в отсутствие селекционного давления благодаря антибиотику ампициллину. В регулярные интервалы берут из культуры пробы и испытывают бактерии на содержание интерферона.

Из этого устанавливают, что pER 33 бактерии, содержащие pER 33, после примерно 60 генераций продуцируют интерферон. Бактерии, которые содержат par pER 33, продуцируют интерферон α . А спустя еще 120 генераций.

Таким образом, показано, что введение par-Lokus в pER 33 (par pER 33)

повышает стабильность плазмиды в *Escherichia coli* HB 101.

5 Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pER-33, кодирующей зрелый α -интерферон человека путем выделения промотор-операторной области размером 90 bp из плазмиды pBR 101 в результате обработки фрагмента ДНК, кодирующего триптофановый оперон *Serratia marcescens* размером 1000 bp эндонуклеазами Eco RI 6-мера 5'-GAATTC и Hae III 4-мера 5'-GGCC, конструировании последовательности рибосомного связывания - RBS из трех синтетических олигонуклеотидов 6-мера 5'-TCCTTA, 10-мера 5'-AGCTTAAACC и 12-мера 5'-TAAGGAGGTTTA, с последующим лигированием Eco RI-Hae III-фрагмента, кодирующего промотор-операторную область с последовательностью рибосомного связывания и дальнейшим встраиванием промотор-операторного RBS-фрагмента в плазмиду pBR 322 путем лигирования большого фрагмента Eco RI-Hind III размером 4332 bp с промотор-оператором RBS-фрагментом, с последующей трансформацией бактерии *Escherichia coli* полученными рекомбинантными плазмидами и отбором клонов, содержащих плазмиду pBR 103, при этом структурный ген α -интерферона получают в результате лигирования Ava II-фрагмента размером 646 bp из Pst I-вставки клона 1F7 со смесью фрагментов размером 34 bp и 143 bp, полученных в результате обработки Pst I-вставки клона 1F7, эндонуклеазой Sau 3A, фосфорилированием полученного фрагмента длиной 177 bp с последующей обработкой Ava II-эндонуклеазой и связыванием с олигонуклеотидным комплексом, сконструированным из синтетических олигонуклеотидов 14-мера 5'-TGTGATCTGCCCTCA, 12-мера 5'-AGCTTAAAGATG, 9-мера 5'-CAGATCACA и 8-мера 5'-CATCTTTA, лигаты фосфорилируют и сшивают с 0,05 мкг Hind III, разрезанного и обработанного фосфатазой pER 103 с последующим трансформированием штамма бактерий *E. coli* HB 101 полученными плазмидами и отбором клонов, содержащих конечную плазмиду.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, с целью повысить

ния стабильности плазмиды, плазмиду рER 33 обрабатывают Eco RI-эндонуклеазой и щелочной фосфатазой, фрагмент размером 5300 bp связывают с p_g-Lokus, который получают путем лигирования Eco RI фосфорилированного линкера с 8 мкг плазмиды рRM 31, предварительно расщепленной Ava I-эндонуклеазой и затупленной с помощью фрагмента Klenow полимеразы I в присутствии dATP, dGTP, dCTP и dTTP, полученной рекомбинантной ДНК трансформируют штамм E.coli HB 101 и отбирают клоны, содержащие плазмиду p_g рER 33.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода α-интерферона, концы Eco RI-Bam HI-фрагмента размером 1300 bp плазмиды рER 33 затупляют Klenow-фрагмента ДНК полимеразы I в присутствии dATP, dGTP, dCTP и dTTP и лигируют с Eco RI фосфорилированным линкером, полученный фрагмент встраивают в линеаризованную плазмиду рER 33, обрабатывают щелочной фосфатазой и лигируют с выделенным ранее геном.

Редактор М. Недолуженко

Техред Л. Олейник

Корректор М. Шароши

Заказ 4080/59

Тираж 520

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4