



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

224618

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 27 07 81
(21) (PV 5693-81)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/34

(40) Zveřejněno 25 02 83

(45) Vydáno 15 01 86

(72) Autor vynálezu

SÁGI JÁNOS, ÖTVÖS LÁSZLÓ, FRITSCHÉ ILDIKÓ, SZABOLCS ANNA,
SZEMZŐ ATTILA, KRUPPA GÁBOR, PÁL IVÁN, BUDAPEŠT (MLR)

(73) Majitel patentu

MTA KÖZPONTI KÉMIAI KUTATÓ INTÉZETE, BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob syntézy polydesoxynukleotidů

Vynález se týká způsobu přípravy polydesoxynukleotidů z 2'-desoxynukleotid-5'-trifosfátů enzymem DNA-polymerasa, který má více než jednu volnou merkaptoskupinu, nepatřící k aktivnímu centru, v přítomnosti dvojmočného kationtu a popřípadě vzorového primárního komplexu ve vodném pufovaném prostředí o hodnotě pH 6,5 až 9,5, odpovídajícím používanému enzymu, při teplotě 15 až 42 °C.

Vzorovým primárním komplexem je vzorová molekula, která je identická s vyráběnými, žádanými polydesoxynukleotidy.

Je známo, že se enzymatické syntézy polydesoxynukleotidů provádějí způsobem s homogenní fází. Takový způsob je popsán například v těchto publikacích: J. F. Burd a R. D. Wells, J. Mol. Biol. 53, str. 435 až 459 (1970); F. J. Bollum, Procedures in Nucleic Acid Research, str. 591, vydavatel Cantoni, G. L. a Davies, D. R., New York, Harper a Row (1966); J. Sági, A. Szabolcs, A. Szemző a L. Ötvös, Nucleic Acid Research, 4, str. 2 767 až 2 777 (1977). Při těchto způsobech obsahuje pufovaná reakční směs substrát, vzorový primární komplex, enzym a kationty, které zajišťují optimální funkci enzymu. Reakční směs se inkubuje, po ukončení reakce se enzym denaturuje (například zahřátím reakční směsi), pak se vyloučená enzymatická bílkovina ze směsi odstraní. Ze získané polydesoxynukleotidové směsi se polymery s vysokou molekulovou hmotností získají čištěním dialýzou.

Takto připravených polydesoxynukleotidů se používá jakožto DNA-modelu pro fyzikální, chemické, biochemické a biologické studium nukleových kyselin.

Obecně používaným DNA-modelem je například kopolymer 2'-desoxyadenosin-5'-monofosfátu (dAMP) a thymin-5'-monofosfátu (dTMP) s přísně se střídající sekvencí a se dvojitou šroubovicí.

...-dAMP-dTMP-dAMP-dTMP-...,

který má zkratku: poly d(A-T).

V případě od DNA odvozených DNA-polymeras je nukleotidový sled nového DNA-vlákná určen nуклеотидovým sledem vzorové DNA, vnesené do směsi. Pro syntézu poly d(A-T) je tedy zapotřebí takového poly d(A-T) vzorového primárního komplexu. Vnesením odpovídajícího vzorového primárního komplexu je možno vyrábět různé polydesoxynukleotidy, jako například poly/dA/.poly/dT/, poly d/G-C/, poly d/I-C/, poly/dG/.poly/dC/, poly/dI/.poly/C/, přičemž A znamená adenin, T thymin, G guanin, I inosin a C cytosin.

Jednotlivé DNA-polymerasové enzymy jsou naproti tomu schopny také bez z venku vneseného vzorového primárního komplexu tak zvané "denovo" syntézy poly d(A-T). Takovým enzymem je například enzym *E.coli* DNA-polymerasa I.

Nedostatkem známých způsobů pro enzymatickou přípravu polydesoxynukleotidů je skutečnost, že se enzymu může použít toliko jednou a že při zpracování reakční směsi je odstranění enzymu spojeno s jeho denaturalizací.

Je proto třeba vypracovat takový způsob přípravy, který by neměl tento nedostatek.

Základem vynálezu je poznatek, že shora uvedený cíl je dosažitelný, jestliže se syntéza polydesoxynukleotidů provádí za pomoci enzymu vázaného na pevný nosič. Tak se může enzym odstranit z reakční směsi jednoduchým odfiltrováním a může se ho opětovně používat.

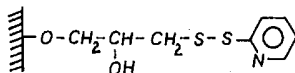
Dalším základem vynálezu je poznatek, že se na pevný nosič mohou vázat a tak pro tento účel používat takové DNA-polymerasové enzymy, které mají více než jednu merkaptoskupinu, která netvoří část aktivního centra enzymu. Těmito skupinami se totiž může enzym substitucí protonu vázat na vhodný nosič, aniž tato vazba způsobuje ztrátu aktivity nebo pokles aktivity.

Na základě shora uvedeného se tedy vynález týká způsobu příprav polydesoxynukleotidů z 2'-desoxynukleosid-5'-trifosfátů s DNA-polymerasovým enzymem, který má více než jednu merkaptoskupinu, které nepatří k aktivnímu centru, v přítomnosti dvojmočného kationu a popřípadě vzorového primárního komplexu ve vodném pufové prostředí o hodnotě pH 6,5 až 9,5, odpovídajícím použitému enzymu, při teplotě 15 až 42 °C. Podle vynálezu se postupuje tak, že se jakožto DNA-polymerasového enzymu používá enzym s merkaptoskupinami schopnými vazby na pevný nosič kovalentní vazbou.

Při provedení způsobu podle vynálezu se jakožto pevného nosiče používá imobilizovaného činidla, které má thiolové skupiny.

K vázání enzymu jsou vhodné takové pevné nosiče, které jsou schopny vázat merkaptoskupinu. K takovým nosičům patří imobilizovaná thiolová činidla s modifikovanou agarosovou bází, jako jsou například Thiopropyl-Sepharosa 6B (Pharmacia Information Booklet, 1977) nebo aktivovaná Thiol-Sepharosa 4B (Pharmacia Information Booklet, 1974).

Struktura Thiopropyl-Sepharosy 6B je



přičemž maticí je modifikovaná agarosa. Thiopropyl-Sepharosa 6B obsahuje 20 μmol 2-thiopyridylových skupin na 1 ml zbotnělého gelu; 1 g lyofilizovaného gelu zaujímá ve zbotnělém stavu objem přibližně 3 ml. 2-Thiopyridylovou skupinou maskovaná a aktivovaná imobilizovaná thiolová skupina se může uvolnit různým způsobem, může se však také uvádět do reakce přímo s merkaptoskupinou za vytvoření disulfidové vazby. Podle informačního materiálu Pharmacia

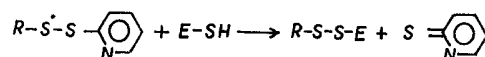
je molární extinkční koeficient přitom odštěpeného 2-thiopyridonu při 343 nm $8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Zvolený pevný nosič se zhotoví v kaliumfosfátovém pufru /hodnota pH 7,4/, pak se plní do kolony a pak se vnese v pufru rozpuštěný enzym.

Podle vynálezu se používá takových enzymů, které obsahují volné merkaptoskupiny schopné reakce. K nim patří z bakterie *Escherichia coli* izolovaný enzym DNA-polymerasa typ I (Kornbergova polymerasa). Je to kulovitá molekula bez podjednotky o molekulové hmotnosti 109 000 g/mol obsahující 975 aminokyselin. Její aktivní centrum obsahuje též lysinovou a argininovou molekulu. V molekule je jedna jediná sulfidová vazba a jedna sulfhydrylová skupina. Sulfhydrylová skupina se může bez snížení aktivity uvádět do reakce s jodacetátem a se solemi rtuť.

Podobně jako enzym z *E. coli* se inhibují také z jiných bakterií (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus lisdolicticus* a *Mycobacterium tuberculosis*) izolované DNA-polymerované enzymy typu I nikoliv sulfhydrylovými činidly, tedy podobně jako se imobilizuje enzym z *E. coli*. Současně se však ze čtyř druhů bakterií izolované DNA-polymerasové enzymy typu II a III inhibují sulfhydrylovými činidly, takže se nemohou vázat shora uvedeným způsobem na pevný nosič. Z organismů savců dosud izolovaných DNA-polymeras (EC.2.7.7.7.) se rovněž alfa-polymerasy a gama-polymerasy inhibují, zatímco beta-polymerasa se sulfhydrylovými činidly neinhubuje.

Na kolonu vnesený, v pufru rozpuštěný enzym se dalším enzymem spláchne do kolony a pak se směs pro co možná dokonalou vazbu desetkrát přečerpá peristaltickým čerpadlem. Reakce probíhá podle reakčního schématu.



kde znamená

E enzym DNA-polymerasu typu I a

R Sepharosa-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-.

Množství vázaného enzymu se může přímo stenovit měřením molární absorpce světla odštěpené 2-thiopyridonové skupiny, nepřímým měřením množství DNA, která se vyrobí syntézou katalyzovanou enzymem.

Po ukončení reakce vázání enzymu se pufr vypustí, gel se promývá dalším čerstvým pufrům zprvu tak dlouho, až spektrum odtékajícího pufru není stejné jako čistého pufru, což je asi 10 ml. Pak se promývá dalšími 40 ml rychlostí 1 ml/min. Pro spektrofotometrii se používá registračního spektrofotometru.

Takto vázaného enzymu se pak používá pro syntézu polydesoxynukleotidů. Pro syntézu použitá reakční směs obsahuje ve vodném prostředí jakožto substrát použité desoxynukleotidy a vzorový primární komplex.

Reakční směs se nastaví pufrům, jehož množství a kvalita musejí zajistit optimální funkci použitého enzymu, na hodnotu pH 6,5 až 9,5. Do reakční směsi se kromě toho přidává kovová sůl zajišťující optimální funkci enzymu, nejlépe hořečnatá sůl, v odpovídající koncentraci.

Kolone se temperuje na 37 °C a nanese se na ni reakční směs o teplotě rovněž 37 °C; pak se přečerpává odpovídajícím peristaltickým čerpadlem.

Postup reakce se může sledovat různými způsoby, například měřením radioaktivity látky nerozpustné v kyselině, papírovou chromatografií, analýzou konečného produktu nebo kontrolní reakcí.

V případě měření radioaktivity musí reakční směs obsahovat také značený substrát. K tomuto účelu se může použít například $[H^3]$ dATP. Měření se provádí tak, že se z kolony vytékající směsi odebírá v určitých časových obdobích vzorek vždy o objemu 25 μ l Hamiltonovou mikropipetou a alikvoty se měří na skleněných filtračních destičkách typu GF/C (průměr 2,5 cm, Whatman). Vkládají se do roztoku (10 ml roztoku na skleněný filtr, 0 až 5 $^{\circ}$ C, 10 minut) ze studené 5% trichloroctové kyseliny o teplotě 0 až 5 $^{\circ}$ C (TCA) a 1% natriumpyrophosphátu, promyjí se dvakrát 5% roztokem trichloroctové kyseliny a pak dvakrát 96% ethylethanolom a nakonec dvakrát diethyletherem a suší se na vzduchu. Radioaktivita v kyselině nerozpustných polymerních molekul (polymeru sestávajícího z více než 10 monomerních molekul) se měří ve směsi s toluenem Packardovým spektrometrem. Tímto způsobem se může sledovat také kontrolní reakce.

Papírová chromatografie je vhodná v případě radioaktivních substrátů ke kvantitativnímu a u neaktivních substrátů naopak ke kvalitativnímu sledování reakce. Na 1 cm široký a 15 až 18 cm dlouhý papírový proužek DE 81 (DEAE-celulóza, Whatman) se nanese 5 až 25 μ l reakční směsi. Jakožto prostředku se používá 0,15 M roztoku hydrogenuhličitanu amonného: R_f hodnoty nukleotidů jsou 0,35 až 0,55, polynukleotidy zůstávají na výchozím bodu.

Do z gelu vypuštěné a vymyté (při 260 nm kontrolované) reakční směsi se přidává roztok obsahující 2,5 molu chloridu sodného a 0,038 molu ethyldiamintetraoctové kyseliny na litr roztoku v objemovém poměru 1 : 0,65 a pak se směs udržuje po dobu 10 minut na teplotě 70 $^{\circ}$ C. Po ochlazení se vytřepe třikrát stejnými objemy směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24 : 1. Dvě fáze se oddělí (odstředěním nebo na papíru k dělení fází, Whatman) a vodná fáze se dialyzuje dvakrát destilovanou vodou za míchání, teplota 4 $^{\circ}$ C, kontinuálně. Měří se vodivost dialyzovaného roztoku. Když vodivost po průtoku 0,8 l dvakrát destilované vody dosáhne hodnoty dvakrát destilované vody (0,2 až 0,6 μ S) dialyzuje se dalšími 0,4 až 0,5 litry dvakrát destilované vody. Pak se produkt lyofilizuje až k suchu a vyjme se do 10^{-3} molu TRIS.HCl (o hodnotě pH 7,4), a 10^{-4} molu ethyldiamintetraoctové kyseliny; roztok má objem 500 μ l. Ze získaného roztoku odebrané alikvoty se podrobují stanovení koncentrace, ultrafialového spektra, tepelné hyperchromicity a aktivity vzoru. Polymerní roztok se skladuje při teplotě -25 $^{\circ}$ C.

Kontrolní reakce: Do 165 μ l reakční směsi (stejného složení, jako má směs použitá při reakci s imobilizovaným enzymem) se přidá množství enzymu objemově odpovídající a inkubuje se při teplotě 37 $^{\circ}$ C. Vzorek se odebírá ve stejných časových obdobích jako v případě kontrolované reakce a shora popsaným způsobem se nanáší na skleněný filtr (GF/C, zpracovává se a provede se měření.

Skladování a opětné použití imobilizovaného enzymu se provádějí tímto způsobem:

Po vypuštění a vmytí reakční směsi se gel promyje dalšími 100 ml 60 mM kaliumfosfátového pufru a pak 20 ml 0,02% roztoku natriumazidu a v něm se ve sloupci nebo po odstranění z něho skladuje při teplotě 3 až 6 $^{\circ}$ C. Po vmytí natriumazidového roztoku se enzymu může znovu použít; při opětovném použití jeho původní aktivita klesá sotva o 0 až 5 %. Nejvíce znovu zkoumaným a stabilizovaným imobilizovaným enzymem byla E.coli DNA-polymerasa I, stupeň II: v průběhu dvou měsíců se její aktivita při šestkrát opakovaném použití nezměnila.

Způsob podle vynálezu má tyto důležité přednosti:

a) Na pevný nosič kovalentní vazbou vázaný enzym DNA-polymerasa se podílí na syntéze desoxypolynukleotidu reakcí s heterogenní fází, po ukončení reakce se může bez denaturalizace z reakční směsi odstranit.

b) Vázaného enzymu se může opakovaně používat.

c) Vázaného enzymu se také může používat při kontinuálním provozu. Způsob podle vynálezu lezu blíže objasňují příklady provedení.

Příklad 1

a) Způsob přípravy Thiopropyl-Sepharosy 6B

1 g lyofilizovaného obchodního thiolového činidla Thiopropyl-Sepharosa 6B se nechává zbotnat po dobu 15 minut při teplotě místnosti v 60 mM kaliumfosfátového pufru (hodnota pH 7,4), pak se plní do skleněné kolony s pláštěm a se skleněným filtrem (1,5 x 15 cm) a promyje se 200 ml horkého pufru, aby se obchodní přídávky stabilizační prostředek vymyl.

b) do přibližně 0,5 ml pufru nad usazeným, bublin prostým gelem se přidá 100 jednotek (20 μ l) E.coli MRE 600 DNA-polymerasy I, stupeň I s měrnou aktivitou 3 850 jednotek/mg bílkoviny Hamiltonovou mikropipetou. (Jedna jednotka enzymu DNA-polymerasa vestaví 10 nmolu celkového nukleotidu při teplotě 37 °C v průběhu 30 minut do v kyselině nerozpustného polymeru v přítomnosti odpovídajícího vzorového primárního komplexu v určitém pufru). Pomalým odkapáváním se vpustí do gelové vrstvy (0,1 až 0,2 ml/min) a spláchne se do ní dalšími 10 ml pufru při teplotě místnosti a pak se přečerpá desetkrát peristaltickým čerpadlem.

c) Syntéza poly d(A-T)

Sloupce se temperují termostatem na 37 °C a pak se do gelu vpustí 10 ml reakční směsi tohoto složení: 60 mmol/l kaliumfosfátu hodnota pH 7,4), 6 mmol/l chloridu hořečnatého, 1 mmol/l [H^3] dATP jehož měrná aktivita je 10,9 rozpadů/min na mol, 1 mmol/l dTTP, 100 umolu [P] /l aktivovaného poly d(A-T/ vzorového primárního komplexu rozpuštěného dvakrát destilovanou vodou na objem 10 ml. Mrtvému prostoru odpovídajících 2 až 3 ml pufru (kontrolováno spektrofotometricky) se vylije, pak se reakční směs peristaltickým čerpadlem přečerpává rychlostí 0,5 ml/min. Postup reakce se může sledovat měřením radioaktivity.

Po reakční době 24 hodin je vzniklé množství polymeru na základě vestevění [H^3] dAMP do v kyselině nerozpustné látky 3,04 mg. Spotřebuje se 45 % substrátu.

Z takto získaného poly d(A-T/ se oddělí dialýzou látky s nízkou molekulovou hmotností. Množství čistého a nativního poly d(A-T/ s vysokou molekulovou hmotností 200 000 g/mol je 2,2 mg.

Příklad 2

Způsobem popsaným v příkladu 1 se váže 150 jednotek (100 μ l) enzymu E.coli MRE DNA-polymerasa I, stupeň II s měrnou aktivitou 116 jednotek/mg bílkoviny na imobilizované thiolové činidlo. Syntéza se provádí způsobem popsaným v příkladu 1. Jakožto substrátu se používá 2 mmol/l [H^3] dATP a 2 mmol/l dTTP. Množství takto v průběhu 4 hodin syntetizovaného polymeru je podle měření radioaktivity 2,37 mg, spotřeba substrátu je 18 %. Molekulová hmotnost izolovaného a čistého polymeru je nízká (5 až 200 000 g/mol), jeho množství je 1,78 mg.

Příklad 3

Na imobilizované thiolové činidlo se váže způsobem popsaným v příkladu 1 45 jednotek (50 μ l) enzymu E. coli MRE 600 DNA-polymerasa I ve formě fragmentu (enzym A podle Klenowa) s měrnou účinností 6 940 jednotek na mg bílkoviny. Také syntéza se provádí způsobem popsaným v příkladu 1. Jakožto substrátu se používá 0,5 mmol/l [H^3] dATP a 0,5 mmol/l dTTP. Podle měření radioaktivity je množství takto v průběhu 24 hodin syntetizovaného veškerého polymeru 22,74 mg,

spotřeba substrátu je 82 %. Izolovaný, čištěný poly d/A-T/ má vysokou molekulovou hmotnost (větší než 200 000 g/mol) a jeho množství je 2,12 mg.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob syntézy polydesoxynukleotidů z 2'-desoxynukleotid-5'-trifosfátů, jako je 2'-desoxyadenosin-5'-trifosfát a thymidin-5'-trifosfát nebo 2-desoxyguanosin-5'-trifosfát a 2'-desoxycytidin-5'-trifosfát, DNA-polymerasovým enzymem, který má alespoň jednu merkaptoskupinu, která nepatří k aktivnímu centru, v přítomnosti dvojmocného kationtu a popřípadě vzorovému primárnímu komplexu v pufovaném vodném prostředí o hodnotě pH 6,5 až 9,5, odpovídajícím použitému enzymu, při teplotě 15 až 42 °C, vyznačující se tím, že se jako DNA-polymerasevého enzymu používá enzymu vázaného kovalentní vazbou na pevný nosič schopný vázat merkaptoskupiny, kterým je imobilizované činidlo obsahující thiolovou skupinu.