

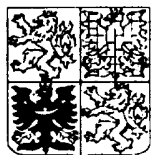
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 596

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **6360-81**

(22) Přihlášeno: 26. 08. 81

(30) Právo přednosti:
26. 08. 80 US 80/181348

(40) Zveřejněno: 15. 02. 95

(47) Uděleno: 10. 01. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13. 03. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/18

C 12 N 15/63

C 12 N 15/70

(73) Majitel patentu:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA, San Francisco, CA, US;

(72) Původce vynálezu:

Miller Walter L., San Francisco, CA, US;

Martial Joseph A., Sart-Tilman, BE;

Baxter John D., San Francisco, CA, US;

(54) Název vynálezu:

**Způsob výroby vektoru pro přenos,
molekula DNA, rekombinantní systém pro
expresi kódové DNA a způsob výroby
bílkoviny, obsahující aminokyseliny 2 až
191 růstového hormonu**

(57) Anotace:

Postup výroby vektoru pro přenos, obsahujícího kódovou DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, spočívá v tom, že se první DNA, obsahující kódový řetězec pro aminokyselinu 2 až 191 růstového hormonu skotu, uvede do styku s druhou DNA, obsahující linearizovaný plasmid hostitele, za vzniku vektoru pro přenos, který se pak izoluje. Součástí řešení je také molekula DNA, obsahující kódové řetězce pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, a rekombinantní systém pro expresi této kódové DNA, který mimo kódové DNA obsahuje ještě řídicí řetězec, kompatibilní s hostitelskou buňkou. Součástí řešení je také způsob výroby odpovídající bílkoviny s obsahem aminokyselin 2 až 191 růstového hormonu, při němž se pěstují buňky s obsahem rekombinantního systému pro expresi a vzniklá bílkovina se izoluje.

CZ 280 596 B6

Způsob výroby vektoru pro přenos, molekula DNA, rekombinantní systém pro expresi kódové DNA a způsob výroby bílkoviny, obsahující aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby vektoru pro přenos, molekuly DNA, rekombinantního systému pro expresi kódové DNA a způsobu výroby bílkoviny, obsahující aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu.

Dosavadní stav techniky

Růstový hormon je polypeptidový hormon, který je vytvářen a vylučován adenohypofýzou, to jest předním lalokem hypofýzy. Růstový hormon se vytváří nejprve jako bílkovinný prekurzor, který obsahuje N-terminální signální peptid a kódový řetězec pro růstový hormon. Řetězec aminokyselin v růstovém hormonu skotu je znám a byl popsán v publikaci Dayhoff M.D. a další, Atlas of Protein Sequence and Structure, sv. 5, doplněk 3, str. 245 až 352, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1978.

Růstový hormon se za normálních podmínek produkuje celý život, i když největší množství se produkuje v období dospívání. Hormon je nutný pro růst v období dospívání. Přestože mechanismus působení hormonu není zcela znám, je známo, že je nutný hlavně pro růst kostí, udržení dusíku, výrobu bílkovin a rovněž k ovlivnění metabolismu glukózy a tukových látek. Jinak řečeno, jde o obecně anabolický hormon.

Použití růstového hormonu skotu se zakládá na jeho známé biologické účinnosti, tak jak byla svrchu popsána. Růstový hormon skotu je možno podávat mladému skotu ke zvýšení rychlosti růstu a ke zvýšení přírůstků, čímž se zkracuje doba, která je nutná k dosažení jatečné váhy. Výsledný vzestup produkce masa může být velmi významný. Mimoto se růstový hormon skotu liší od růstového hormonu ovce pouze obsahem několika aminokyselin. Z tohoto důvodu je možno podávat růstový hormon skotu ovčím se stejnými výsledky jako u skotu, to jest ke zvýšení rychlosti růstu a přírůstků a tím i ke zvýšení produkce masa. Růstový hormon skotu je rovněž možno podávat vepřům ke stejnému účelu a se stejným výsledkem.

Základní postup pro klonování sledů DNA je nyní znám. Například v publikaci Seeburg P.H. a další, Nature, 270, 486, 1977 se popisuje klonování genu pro růstový hormon krysy. V publikaci Shine J. a další, Nature, 270, 494, 1977, se popisuje klonování genu pro lidský choriový somatomamotropin. V publikaci Derynck R. a další, Nature 285, 542, 1980, se popisuje klonování genu pro lidský interferon z fibroblastu.

Způsoby exprese heterologní DNA v mikroorganismech jsou nyní také známy. Zásadně se postupuje tak, že se řetězec, který je kódem pro heterologní DNA, včlení do vektoru pro přenos DNA v místě, které se nachází uvnitř operonu, který je schopen exprese. Pro výrobu hybridní bílkoviny musí být včleněný řetězec ve správné fázi se sledem operonu a musí být orientován ve stejném směru vzhledem ke translaci. V případě těchto podmínek se při

translaci operonu přenáší i včleněný řetězec, takže vzniklá bílkovina obsahuje N-terminální řetězec aminokyselin, který je kódem pro operon, schopný exprese, a mimoto řetězec aminokyselin, který je kódem pro včleněnou část. Tyto postupy byly popsány v publikacích Polisky B. a další, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 73, 3900, 1976, Itakura K. a další, Science, 198, 1056, 1979. Nyní se užívají různé operony, schopné exprese, včetně operonu pro beta-galaktosidázu, beta-laktamázu a tryptofan.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob výroby vektoru pro přenos, obsahujícího kódovou DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, který spočívá v tom, že se první DNA, obsahující kódový řetězec pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, uvede do styku s druhou DNA, obsahující linearizovaný plasmid hostitele za vzniku vektoru pro přenos, který se pak izoluje.

Součástí podstaty vynálezu je také molekula DNA, obsahující kódové řetězce pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu.

Podstatu vynálezu tvoří rovněž rekombinantní systém pro expresi kódové DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu v hostitelské buňce, který obsahuje kódovou DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, operativně vázanou na řídicí řetězec, kompatibilní s hostitelskou buňkou.

Součástí podstaty je i způsob výroby bílkoviny, obsahující aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, přičemž se pěstují buňky, obsahující systém, který v hostitelské buňce ovlivňuje expresi kódové DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, přičemž tento systém je tvořen kódovou DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového řetězce hormonu skotu, operativně vázanou na řídicí řetězec, kompatibilní s buňkou hostitele, a vzniklá bílkovina se z kultury izoluje.

Ve výhodném provedení obsahuje kódová DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu kódového řetězce pro další aminokyseliny a je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu.

Ve výhodném provedení obsahuje deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro prekurzor růstového hormonu, navíc následující řetězec

```

5' - ATG ATG GCT GCA GGC CCC CGG ACC TCC CTG
CTC CTG GCT TTC GCC CTG CTC TGC CTG CCC TGG ACT CAG GTG
GTG GGC GCC TTC CCA GCC ATG TCC TTG TCC GGC CTG TTT GCC
AAC GCT GTG CTC CGG GCT CAG CAC CTG CAC CAG CTG GCT GCT
GAC ACC TTC AAA GAG TTT GAG CGT ACC TAC ATC CCG GAG GGA
CAG AGA TAC TCC ATC CAG AAC ACC CAG GTT GCC TTC TGC TTC
TCC GAA ACC ATC CCG GCC CCC ACG GGC AAG AAT GAG GCC CAG
CAG AAA TCA GAC TTG GAG CTG CTT CGC ATC TCA CTG CTC CTC
ATC CAG TCG TGG CTT GGG CCC CTG CAG TTT CTC AGC AGA GTC
TTC ACC AAC AGC TTG GTG TTT GGC ACC TCG GAC CGT GTC TAT
GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAA GGC ATC TTG GCC CTG ATG
CGG GAG CTG GAA GAT GGC ACC CCC CGG GCT GGG CAG ATC CTC
AAG CAG ACC TAT GAC AAA TTT GAC ACA AAC ATG CGC AGT GAC

```

GAC GCG CTG CTC AAG AAC TAC GGT CTG CTC TCC TGC TTC CGG
 AAG GAC CTG CAT AAG ACG GAG ACG TAC CTG AGG GTC ATG AAG
 TGC CGC CGC TTC GGG GAG GCC AGC TGT GCC TTC TAG- 3'

kde

A znamená deoxyadenyl,
 G znamená deoxyguanyl,
 C znamená deoxycytosyl a
 T znamená thymidyl.

Podle dalšího výhodného provedení se připravuje deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro růstový hormon skotu tak, že se štěpí cDNA (deoxynukleotidový řetězec, který je prekurzorem pro prekurzor růstového hormonu skotu), působením restrikčního enzymu Hae II a rozštěpený produkt se inkubuje s enzymem, který se volí ze skupiny, obsahující Klenowův fragment. DNA-polymerázy I, T4 DNA polymerázy nebo 3', 5'-exonukleázy.

Podle dalšího provedení se připravuje řetězec pro růstový hormon skotu tak, že se inkubace se svrchu vedeným Klenowovým fragmentem provádí za přítomnosti dATP a výsledný produkt se rozkládá S1 nukleázou, čímž se získá deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, a výsledkem je deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro růstový hormon skotu a navíc obsahuje řetězec následujícího složení:

5' - TTC CCA GCC ATG TCC TTG TCC GGC CTG TTT
 GCC AAC GCT GTG CTC CGG GCT CAG CAC CTG CAC CAG CTG GCT
 GCT GAC ACC TTC AAA GAG TTT GAG CGT ACC TAC ATC CCG GAG
 GGA CAG AGA TAC TCC ATC CAG AAC ACC CAG GTT GCC TTC TGC
 TTC TCC GAA ACC ATC CCG GCC CCC ACG GGC AAG AAT GAG GCC
 CAG CAG AAA TCA GAC TTG GAG CTG CTT CGC ATC TCA CTG CTC
 CTC ATC CAG TCG TGG CTT GGG CCC CTG CAG TTT CTC AGC AGA
 GTC TTC ACC AAC AGC TTG GTG TTT GGC ACC TCG GAC CGT GTC
 TAT GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAA GGC ATC TTG GCC CTG
 ATG CGG GAG CTG GAA GAT GGC ACC CCC CGG GCT GGG CAG ATC
 CTC AAG CAG ACC TAT GAC AAA TTT GAC ACA AAC ATG CGC AGT
 GAC GAC GCG CTG CTC AAG AAC TAC GGT CTG CTC TCC TGC TTC
 CGG AAG GAC CTG CAT AAG ACG GAG ACG PAC CTG AGG GTC ATG
 AAG TGC CGC CGC TTC GGG GAG GCC AGC TGT GCC TTC TAG - 3'

kde

A znamená deoxyadenyl,
 G znamená deoxyguanyl,
 C znamená deoxycytosyl a
 T znamená thymidyl.

Podle dalšího provedení se získává řetězec pro růstový hormon skotu tak, že se inkubace se svrchu uvedeným Klenowovým fragmentem provádí za přítomnosti dATP, dGTP, dCTP a dTTP a výsledný produkt se inkubuje s enzymem, který se volí ze skupiny, obsahující Klenowův fragment, T4 DNA polymerázu nebo 3', 5'-exonukleázu za přítomnosti dCTP a výsledný produkt se podrobí působení S1

nukleázy, čímž se získá deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro aminokyselinu 1 až 191 růstového hormonu skotu za vzniku desoxynukleotidového řetězce, který je kódem pro růstový hormon skotu a navíc obsahuje řetězec následujícího složení:

```

      5' - GCC TTC CCA GCC ATG TCC TTG TCC GGC CTG TTT
GCC AAC GCT GTG CTC CGG GCT CAG CAC CTG CAC CAG CTG GCT
GCT GAC ACC TTC AAA GAG TTT GAG CGT ACC TAC ATC CCG GAG
GGA CAG AGA TAC TCC ATC CAG AAC ACC CAG GTT GCC TTC TGC
TTC TCC GAA ACC ATC CCG GCC CCC ACG GGC AAG AAT GAG GCC
CAG CAG AAA TCA GAC TTG GAG CTG CTT CGC ATC TCA CTG CTC
CTC ATC CAG TCG TGG CTT GGG CCC CTG CAG TTT CTC AGC AGA
GTC TTC ACC AAC AGC TTG GTG TTT GGC ACC TCG GAC CGT GTC
TAT GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAA GGC ATC TTG GCC CTG
ATG CGG GAG CTG GAA GAT GGC ACC CCC CGG GCT GGG CAG ATC
CTC AAG CAG ACC TAT GAC AAA TTT GAC ACA AAC ATG CGC AGT
GAC GAC GCG CTG CTC AAG AAC TAC GGT CTG CTC TCC TGC TTC
CGG AAG GAC CTG CAT AAG ACG GAG ACG TAC CTG AGG GTC ATG
AAG TGC CGC CGC TTC GGG GAG GCC AGC TGT GCC TTC TAG - 3'

```

kde

A znamená deoxyadenyl,
 G znamená deoxyguanyl,
 C znamená deoxycytosyl a
 T znamená thymidyl.

Podle dalšího provedení se získá plasmid pBP348 s obsahem prekursoru růstového hormonu skotu tak, že molekulou DNA, připravenou štěpením vektoru pro přenos restriční enzymem, je pBR322 a restričním enzymem je Pst 1.

Podle dalšího provedení pro výrobu vektoru pro přenos DNA s obsahem řetězce pro růstový hormon skotu se postupuje tak, že se uvede v reakci připravený deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro růstový hormon skotu, s molekulou DNA, připravenou štěpením vektoru pro přenos působením restričního enzymu.

Podle dalšího provedení způsobu výroby vektoru pro přenos a expresi se postupuje tak, že se molekula DNA, připravená štěpením vektoru pro přenos působením restričního enzymu, štěpí v místě, kde se nachází řídicí oblast pro expresi.

Podle dalšího provedení se provádí způsob výroby bílkoviny, obsahující řetězec aminokyselin prekursoru růstového hormonu skotu nebo aminokyselin pro růstový hormon skotu jako koncový řetězec na zakončení, které obsahuje uhlíkový atom a část prokaryotické bílkoviny jako N-terminální řetězec tak, že se inkubuje mikroorganismus, transformovaný vektorem pro přenos a expresi, obsahující deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro prekursor růstového hormonu skotu nebo pro růstový hormon skotu.

Podle dalšího provedení se způsob pro syntézu růstového hormonu skotu provádí tak, že se inkubuje mikroorganismus, transformovaný vektorem pro přenos a expresi s obsahem deoxynukleotidového řetězce, který je kódem pro růstový hormon skotu za podmínek,

vhodných pro expresi tohoto kódu pro růstový hormon skotu s následným čištěním růstového hormonu skotu po jeho izolaci z rozrušených buněk mikroorganismu, nebo ze živného prostředí.

Při provádění způsobu podle vynálezu je nutno klonovat DNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu nebo pro růstový hormon skotu a dosáhnout exprese klonované DNA v mikroorganismech.

mRNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu, se izoluje z hypofýzy skotu. Obrácený předpis (cDNA-kopie) této mRNA se připraví a včlení do vektoru propenos. Pak se připraví deoxynukleotidový řetězec, který je kódem pro růstový hormon skotu, hydrolýzou řetězce, který je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu. Vektor pro přenos se pak užije k transformování bakterií, v nichž dochází k expresi tímto způsobem klonování cDNA.

Řetězec DNA, který je kódem pro růstový hormon skotu, se získá pomocí cDNA. Zásadní postup při provádění tohoto způsobu je znám a je popsán například ve svrchu uvedených publikacích Seeburga P.H. a dalších a Deryncka a dalších. Použitá cDNA se získá při použití RNA, extrahované z hypofýz skotu.

DNA, izolovaná z hypofýz skotu běžným způsobem, se pak izoluje jako polyadenylovaná RNA specifickou chromatografií. Integrita této polyadenylované RNA se pak prokáže translací polyadenylované RNA způsobem, popsaným v publikacích Miller, W.L. a McCarthy B.J., J.Biol. Chem., 254, 742, 1979 a Martial J.A. a další, Proc. Nat. Acad.Sci., USA, 74, 1816, 1977, s následnou analýzou bílkovin, získaných elektroforézou na SDS-akrylamidovém gelu způsobem, popsaným v publikaci Laemmli U.K., Nature, 227, 680, 1970. Růstový hormon skotu je možno dále identifikovat imunologickou srážecí reakcí podle publikace Martial J.A., a další, Proc. Nat. Acad. Sci., USA (viz svrchu).

Polyadenylovaná RNA, která se užije jako matrice při výrobě cDNA s dvojitým řetězcem, se získá běžným způsobem. První řetězec cDNA se získá použitím reverzní transkriptázy, oligo-dT a polyadenylované RNA, způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Millera a McCarthyho a v publikaci Monahan J.J. a další, Biochem., 15, 223, 1976. RNA se odstraní za alkalických podmínek a cDNA s jedním řetězcem se užije pro syntézu druhého řetězce působením reverzní transkriptázy. Klička tvaru vlasničky se odstraní působením S1 nukleázy způsobem podle publikace Leong J.A. a další, J.Virol., 9, 891, 1972, jak bylo popsáno v publikaci Ullrich A. a další, Science, 196:1313, 1977.

Tímto způsobem se získá cDNA, kterou již je možno včlenit do vektoru pro přenos. Vhodným vektorem pro přenos může být vektor, který je schopný transformovat bakterie, například *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* nebo kvasinky, například *Saccharomyces cerevisiae*, dále *inl*, *csp* a *esp* mutanty kmene *Neurospora crassa* a živočišné buňky ve tkáňové kultuře. Příkladem vektorů pro přenos, které je možno užít při provádění způsobu podle vynálezu a které jsou schopny transformovat *Escherichia coli*, mohou být plasmidy pSC101, pMB9, pBR313, pHR315, pBR316 a pBR322 a vektory, odvozené od bakteriofágů, to jest Charon 3A, Charon 4A, Charon

16A a λ_{gtWES} . λ_B . Publikace, které popisují výrobu a vlastnosti těchto vektorů pro přenos, jsou uvedeny v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Vektor	Publikace
pSC101	Cohen a další, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 70, 1293 a 3240, 1977. Boyer a další, Recombinant Molecules, Bears, a další, Eds, Raven Press, NY, str. 13, 1977. Cohen a další, Recombinant Molecular, str. 91.
pMB9	Rodriguez a další, Molecular Mechanisms in Control of Gene Expression (ICN-UCLA Symposium on Mol. Cell. Biol. sv.5), Nieslich a další, Eds., Academic Press, NY, str. 471, 1976. Bolivar a další, Gene, 2, 75, 1977.
pBR313	Bolivar a další, viz svrchu
pBR315	Rodriguez a další, viz svrchu
pBR316	Rodriguez a další, viz svrchu
pBR322	Bolivar a další, Gene, 2, 95, 1977. Bolivar a další, Gene, 4, 121, 1978. Sutcliffe, Cold. Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 43, 77, 1978.
Charon 3A	Blattner a další, Science 196, 161, 1977.
Charon 4A	Blattner a další, viz svrchu
Charon 16A	Blattner a další, viz svrchu
λ_{gtEWS} . λ_B	Tremeier a další, Nature 263, 526 1976. Leder a další, Science, 196, 175, 1977.

Dalšími vhodnými vektory pro transformaci *Escherichia coli* jsou vektory, popsané v publikaci Sinsheimer R.L., Ann. Rev. Biochem., 46, 415, 1977. Vhodné vektory pro transformaci *B. subtilis* byly popsány v publikacích Iordanascu S., J.Bacteriol., 124, 597, 1964 a Ehrlich S. D., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 1680, 1977. Jeden z těchto vektorů byl identifikován jako plasmid pC194. Hybridní plasmidy, obsahující DNA z kvasinek, a to plasmidovou a/nebo chromozonální, jakož i bakteriální DNA, například plasmidovou, je možno použít k transformaci kvasinek. Plasmidy tohoto typu byly popsány v publikacích Beggs J.D., Nature 275, 104, 1978, Asiav C.L. a Carbon J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3829, 1979 a Kingsman A.K. a další, Gene 7, 141, 1979. Vektory pro přenos, které mohou být využity pro tkáňové kultury živočišných buněk, jsou například defektivní adenovirus, defektivní virus SV-40 a virus polyomu.

Získaná cDNA se včlení do vektoru pro přenos běžným způsobem. Včlenění cDNA se obvykle provádí na jakémkoliv místě působení restričního enzymu, které se ve vektoru pro přenos neopakuje. Charon 3A a 4A a λ gtWES. λ B obsahují vždy větší počet míst a v důsledku toho vzniká několik míst pro včlenění vektorů. některé vektory obsahují jediné místo pro působení restričního enzymu. Použitelná místa ve vektorech charon 3A a 4A a λ gtWES. λ B jsou uvedena v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Vektor	Místo pro působení restričního enzymu
PSC101	EcoRI, Hind III, Sal I, Dsm HI, Hpa I, Sma I
pMB9	Eco RI, Hind III, Sal I, Bam HI
pBR313	Eco RI, Hind III, Sal I, Bam HI, Hpa I, Sma I, Xma I
pBR315, pBR322	Rco RI, Hind III, Sal I, Sam HI, Pst I
pBR316	Hind III, Sal I, Bam HI, Pst I
pC194	Hind III
Charon 16A	EcoRI, Sst I
Charon 3A	Eco RI
Charon 4A	Eco RI
λ gt WES. λ B	Eco RI

Obvykle se cDNA včleňuje do restričního místa v oblasti, která určuje ještě další vlastnost fenotypu, protože je to účelné pro selekci. Například Hind III, Sal I a Bam HI v pSC101, pMB9, pBR313, pBR315, pBR316 a pBR322 se nachází v místě pro odolnost proti tetracyklinu nebo v kontrolní oblasti pro tento gen. Včleněním v tomto místě způsobí ztrátu odolnosti proti tetracyklinu. cDNA je možno včlenit do vektoru pro přenos pomocí látek, usnadňujících vazbu v uvedeném místě. Lze postupovat například tak, že se na cDNA naváže syntetický nukleotid, který obsahuje místo pro štěpení určitou restriční endonukleázou, například některou ze svrchu uvedených endonukleáz. Pak se cDNA a vektor pro přenos odděleně inkubují s restriční endonukleázou a pak se spojí za vzniku vektoru s obsahem cDNA. Je také možno postupovat tak, že se na cDNA naváže deoxynukleotid a terminální transferáza, jak bylo popsáno v publikaci Roychoudhury R. a další, Nucl. Acids, Res., 3, 863, 1976. Po působení restriční endonukleázy je pak možno vektor pro přenos vázat na doplňkový deoxynukleotid stejným

způsobem. Vektor pro přenos s navázaným deoxynukleotidem a cDNA s navázaným deoxynukleotidem se pak spojí za vzniku vektoru s obsahem cDNA. Je například možno na cDNA navázat dC a pak otevřít vektor v místě pro působení Pst I a navázat dG.

Pak se použije vektor s obsahem cDNA pro transformaci vhodného hostitele. Vhodným hostitelem pro různé vektory mohou být například *E. coli*, *B. subtilis*, kvasinky, *N-crass* a tkáňové kultury živočišných buněk. Vektory, vhodné pro transformaci těchto hostitelů, byly uvedeny svrchu. Obvykle se užívají tři mutanty *Escherichia coli*. Jde o *chl776*, *RRI* a *HB101*. *Escherichia coli chl776* byl popsán v publikaci Curtis R., *Ann. Rev. Microbiol.*, 30, 507, 1976 a v US patentu č. 4 190 495. *Escherichia coli RRI* byl popsán v publikaci Eugaiczky A. a další, *Molecular Mechanisms in Control of Gene Expression* na str. 543. *Escherichia coli HB101* byl popsán v publikaci Kedes D.H. a Thomass C.A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 73, 1537, 1976. Vhodný hostitel se transformuje běžným způsobem. Například *Escherichia coli chl776* se transformuje vektorem s obsahem cDNA způsobem, popsaným v publikaci Cooke N.E. a další, *J. Biol. Chem.*, 255, 6502, 1980. Kolonie se podrobí selekci a/nebo výběru běžným způsobem. Je možno například postupovat podle ztráty některé vlastnosti, například odolnosti proti tetracyklinu. Selekcí je možno provádět tak, že se

- 1) odstraní cDNA příslušnou restriční endonukleázou a pak se analyzuje elektroforézou a hybridizací způsobem podle publikace Southern B.M., *J. Mol. Biol.*, 98, 503, 1975, nebo se
- 2) opakovaně pěstuje transformovaný mikroorganismus způsobem podle publikace Grunstein M. a Hagness D. S., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 72, 3961, 1975 za současné hybridizace, nebo se
- 3) kolonie přímo zkoumají na schopnost exprese RIA nebo jiným způsobem.

DNA, která je kódem pro růstový hormon skotu, se připravuje například z části, která je kódem pro prekursor růstového hormonu skotu. Z ní se DNA odstraní působením vhodné restriční endonukleázy. Například v případě, že se cDNA včlení do místa pro působení Pst I v plasmidu pBK322, je možno tuto včleněnou část odstranit částečným působením enzymu Pst I, protože cDNA pro růstový hormon skotu uvnitř obsahuje ještě dvě místa pro působení tohoto enzymu. Pak se cDNA rozloží enzymem Hae II. Je také možno postupovat tak, že se rekombinantní plasmid, odvozený od pBR322, podrobí působení Hae II k odstranění části včleněné cDNA. Štěpení působením Hae II odstraní DNA, které je kódem pro N-terminální signální peptid, a dvě ze tří bází, které jsou kódem pro N-terminální Ala růstového hormonu. Tyto báze se pak nahradí inkubací včleněné části s Klenowovým fragmentem DNA-polymerázy I a s deoxynukleotidem. Rovněž je možno postupovat tak, že se báze, které jsou kódem pro Ala, rozruší inkubací cDNA s Klenowovým fragmentem, T4 DNA-polymerázou nebo 3', 5'-oxonukleázou za přítomnosti dATP. Klenowův fragment byl popsán v publikaci Klenow M. a Henningsen I., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 65, 168, 1970. cDNA, která je kódem pro růstový hormon, se pak včlení do vhodného vektoru pro přenos svrchu uvedeným způsobem.

Klonované DNA se podrobí expresi v bakteriích za vzniku bílkoviny, která obsahuje růstový hormon skotu, pro nějž je kódem včleněný řetězec, nebo pouze růstový hormon. K dispozici je několik možných postupů, například

- a) modifikace řetězce, který je užit jako kód za vzniku přesného výchozího bodu pro translaci,
- b) selekce nebo konstrukce optimálního vektoru pro expresi,
- c) další zpracování po translaci buňek in vivo s využitím aktivity hostitele, nebo in vitro chemickým způsobem a
- d) přímá exprese.

V případě, že dochází k expresi složené bílkoviny, je obvykle možno upustit od modifikace klonovaného řetězce nukleotidů, pokud výsledný sled dovoluje translaci včleněné části ve správné fázi a pokud nejsou obsaženy žádné kodony, které by způsobily zastavení translace před počátečním kodonem včleněného řetězce.

Je možno dosáhnout exprese prekursoru růstového hormonu nebo růstového hormonu ve formě složené bílkoviny tak, že se včlenění cDNA do příslušného místa uvnitř operonu, schopného exprese, včetně například místa pro působení enzymu Pst I v genu pro beta-laktamázu v plasmidu pBR322, jak bylo popsáno v publikacích Villa-Komaroff L. a další, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 75, 3727, 1978, Serburg P. a další, Nature 274:795, 1978, místa pro působení enzymu EcoRI v plasmidu pB322, který nese lac řídící oblast a řetězec, který je kódem pro beta-galaktosidázu, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Itakura K., nebo místo pro působení enzymu Hind III v genu trpD v plasmidu ptrpED50, jak bylo popsáno v publikaci Martial J. a další, Science, 205, 502, 1979. Modifikace délky řetězce o jeden nebo dva nukleotidy za účelem dosažení správného sledu při translaci je známa. Včleněním těchto nukleotidů do místa pro působení enzymu Pst I v plasmidu pBR322 svrchu popsaným způsobem vede k odčítání ve správné fázi s pravděpodobností 1/6.

Prekurzor růstového hormonu a růstový hormon se připravuje ze složení bílkoviny, schopné specifického štěpení in vitro. Klonovaný řetězec nukleotidů se modifikuje tak, aby byl kódem pro řetězec aminokyselin při specifické proteolytické enzymu. Vhodným řetězcem je AspAspAspAspLys, který je přednostně štěpen enzymem enterokinázou, jak je popsáno v současně podávané US přihlášce č. 125 878, podané 29. února 1980. Jak je v této přihlášce popsáno, včlenění se řetězec nukleotidů, který je kódem pro svrchu uvedený sled aminokyselin, a to těsně v blízkosti nukleotidového řetězce, který je kódem pro N-terminální sled prekursoru růstového hormonu.

V případě prekursoru růstového hormonu znamená toto včlenění modifikaci původně včleněné cDNA odstraněním nukleotidu v poloze 5' řetězce, který je kódem pro prekursor růstového hormonu. Svrchu uvedená cDNA, která je včleněna v případě růstového hormonu, nemusí být modifikována. Modifikace včleněné části pro prekursor růstového hormonu se dosahuje buď řízeným působením exonukleázy nebo T4 DNA-polymerázy na zakončení 3', nebo kombinací

štěpení endonukleázou v místě, které je v žádoucí vzdálenosti od zakončení 5', s následnou chemickou syntézou, která obnoví tu část žádaného řetězce, která byla odstraněna. Další podrobnosti tohoto postupu jsou popsány v US přihlášce č. 125 878. Při tomto postupu se s výhodou užívá T4 DNA-polymerázy a S1 nukleázy a získá se cDNA řetězec, který je kódem pro prekurzor růstového hormonu, bez oblasti 5'. Řetězec nukleotidů, který je kódem pro svrchu uvedený řetězec aminokyselin, se naváže na cDNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu nebo pro růstový hormon, přičemž se působí DNA-ligázou, jak bylo popsáno v publikaci Valenzuela a další, *Nature*, 280, 815, 1979. Modifikovaný řetězec cDNA se pak včlení do vektoru pro expresi složené bílkoviny, tak jak bylo svrchu popsáno. Hostitelské bakterie, například *Escherichia coli* HB101, RRI nebo *chl776*, nebo jiné bakterie, se transformují působením vektoru, který nese kód pro prekurzor růstového hormonu. Transformované kolonie se třídí na odolnost proti ampicilinu. Vybrané kolonie se pak pěstují za podmínek, vhodných pro expresi složené bílkoviny. Po expresi této bílkoviny se prekurzor růstového hormonu nebo růstový hormon odštěpí enzymatickou hydrolýzou působením enterokinázy.

Při použití příslušného vektoru pro přenos a expresi je možno dosáhnout přímé exprese prekurzoru růstového hormonu, to jest hormonu, který není vázán na žádnou prokaryotickou bílkovinu. Základním principem pro přímou expresi je skutečnost, že včlenění segment DNA úplně nahradí segment, který je kódem a je přenášén bakteriální řídicí oblastí tak, že základní složka řídicí oblasti, která má být zachována, je ukončena jednotkou pro expresi, která obsahuje promotor a vazné místo ribozomu, schopné působit na organismus hostitele. Není nutné odstranit všechny nukleotidy, které jsou kódem pro hostitelskou část složené bílkoviny. Vztah mezi ribozomálním vazným místem s kodonem AUG, od něhož začíná včleněná část, je takový, že tento kodon může být uložen kdekoli mezi kodonem 3 až 11 ribozomálního vazného místa, jak bylo popsáno v publikacích Shine J. a další, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 71, 1342, 1974 a Steitz J., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 72, 4734, 1975. V oblasti nukleotidů 3 až 11 je AUG prvním kodonem, od něhož začíná translace. V případě *ptrpE30*, který je odvozen od svrchu popsaného *ptrpED50* a obsahuje operátor, promotor, atenuátor a ribozomální vazné řetězce tryptofanového operonu, spolu s řetězcem nukleotidů, který je kódem pro sedm aminokyselin bílkoviny *trp E* s následným místem pro působení enzymu Hind III, je odstranění minimálního množství 23 až 29 nukleotidů z místa pro působení Hind III zapotřebí pro vznik místa pro včlenění cDNA při řízení operonem tryptofanu.

Pro přímou expresi prekurzoru růstového hormonu se původní včleněná cDNA modifikuje svrchu popsaným způsobem k odstranění 5'-nepřenesené oblasti. Vektor pro přímou expresi je možno získat modifikací *ptrpE30*, při níž se odstraní nukleotidy 23 až 29 při použití T4 DNA polymerázy a S1 nukleázy svrchu uvedeným způsobem. Vazný řetězec nukleotidů, který obsahuje restriční místo pro Bam HI endonukleázu, se naváže na modifikovanou cDNA a současně na modifikovaný *ptrpE30* způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Valenzuela a dalších. Tímto způsobem se usnadní včlenění, které se pak provádí v podstatě způsobem, popsaným v publikaci Ullrich A. a další, *Science*, 196, 1313, 1977. Vhodný hostitel, například *Escherichia coli* HB101, RRI nebo *chl776* nebo jiná bak-

terie se transformují rekombinantním vektorem, který nese včleněnou část, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu. Transformované kolonie se podrobí výběru na odolnost proti ampicillinu a pak se pěstují za podmínek, vhodných pro expresi prekurzoru růstového hormonu.

Přímé exprese růstového hormonu je možno dosáhnout způsobem, popsaným v publikaci Gooddel D.V. a další, *Nature*, 281, 544, 1979. Je také možno postupovat tak, že se naváže řetězec nukleotidů s obsahem místa pro působení Bam HI a výchozí kodon AUG na cDNA, která je kódem pro růstový hormon. Takto modifikovaná cDNA se pak včlení do modifikovaného p_{trpE30} svrchu uvedeným způsobem.

Prekurzor růstového hormonu je možno provést na růstový hormon odstraněním N-terminálního řetězce hydrofóbních aminokyselin, které obsahují signální peptidy. In vitro je možno provést odstranění signálního peptidu tak, že se na bílkovinu, extrahovanou z transformovaných buněk, působí přípravek s obsahem "surových" mikrosomů způsobem, popsaným v publikaci Jackson R. C. a Blobel G., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 5598, 1977. In vivo je možno odstranění signálního peptidu provést při přímé bakteriální expresi řetězce, který je kódem pro prekurzor růstového hormonu. Bakteriální signální peptidy a signální peptidy savců mají podobné řetězce. Bílkoviny s obsahem signálních peptidů savců je možno získat pomocí bakteriálních buněk a tak získat růstový hormon buď v periplasmatickém prostoru, nebo v prostředí.

Takto získaný prekurzor růstového hormonu a růstový hormon je možno čistit známým způsobem, například gelovou filtrací, chromatografií na iontoměniči a způsoby, které využívají různé rozpustnosti.

Podrobnosti způsobu podle vynálezu budou dále popsány v průběhu příkladů. V průběhu těchto příkladů bylo působení restričních endonukleáz prováděno za podmínek, optimálních pro každý jednotlivý enzym. Restriční endonukleázy, jejich názvosloví a místa, specifická pro jejich působení, jsou podrobně uvedeny v publikaci Roberts R., *Crit. Rev. Biochem.*, 4, 123, 1976. Tyto enzymy jsou nyní také běžně dodávány New England Biolabs, Cambridge, Massachusetts a současně jsou uvedeny dodavatelem i optimální podmínky pro působení těchto enzymů. Reverzní transkriptázy je možno získat od Dr. J. Beard, Life Sciences, Inc., St. Petersburg, Florida. Použití reverzní transkriptázy a vhodné reakční podmínky pro její působení byly již dříve popsány v publikacích Seeburg P.H. a další, *Nature*, 276, 795, 1978, a ve svrchu uvedených publikacích Seeburga P.H. a dalších a Shine J. a dalších. T4 DNA polymerázy je možno získat od New England Biolabs. Použití T4 DNA polymerázy a vhodné reakční podmínky jsou popsány v US přihlášce č. 125 878. Sl nukleáza z mikrokoků je dodávána z Miles Laboratories, Elkhart, Indiana. Použití Sl nukleázy a vhodné reakční podmínky byly popsány ve svrchu uvedené publikaci Ullricha A. a dalších. Terminální deoxynukleotidová transferáza byla získána od Enzo Biochemicals, New York, New York. Použití tohoto enzymu a vhodné reakční podmínky byly popsány ve svrchu uvedené publikaci Roychoudhury a dalších. Klenowův fragment DNA polymerázy I je možno získat od Boehringer Biochemicals, Indianapolis, Indiana.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Způsob výroby cDNA prekursoru růstového hormonu skotu

Hypofýzy krav se odeberou krátce po porážce a ihned se zmrazí v kapalném dusíku. RNA se připraví homogenizací těchto žláz v roztoku guanidinthiokyanátu podle publikace Chirginwin J.M. a další, Biochem., 18, 5294, 1979. RNA se odstředí v roztoku 7,5 M CaCl způsobem podle svrchu uvedené publikace Ullricha a dalších. Pak se RNA extrahuje fenolem a sráží ethanolem. Polyadenylovaná RNA se čistí při použití chromatografie na oligo-dT-celulóze způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Millera a McCarthyho a v publikaci Aviv N. a Leder D., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 140, 1972.

Polyadenylovaná RNA se přenesse do bezbuněčného systému při použití retikulocytů králíka způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Millera a McCarthyho a v publikaci Martial J.A., a další (1977). Prekursor růstového hormonu skotu, syntetizovaný v tomto systému, se vysráží imunologickým způsobem při použití heterologního antiséra proti růstovému hormonu ovce a získá se adsorpcí na Staphylococcus aureus Cowan I, fixovaný na formaldehyd podle svrchu uvedené publikace Martial J. A. a dalších (1977). ³⁵S-bílkoviny se podrobí elektroforéze na 12,5 % SDS polyakrylamidovém gelu podle svrchu uvedené publikace Laemmliho. Analýza ukazuje, že polyadenylovaná RNA, která je kódem pro prekursor růstového hormonu skotu, tvoří přibližně 12,6 % celkové polyadenylované RNA hypofýzy.

Polyadenylovaná RNA se podrobí reverzní transkripci do cDNA s jedním řetězcem při použití reverzní transkriptázy podle svrchu uvedených publikací Millera a McCarthyho a Monahana a dalších. RNA se odstraní hydrolýzou za alkalických podmínek. Pak se cDNA s jedním řetězcem extrahuje fenolem, chromatografuje na Sephadexu G-50 (Pharmacia, Inc. Uppsala, Švédsko) a vysráží se ethanolem. Pak se cDNA s jedním řetězcem užije k syntéze druhého řetězce cDNA při použití reverzní transkriptázy svrchu popsaným způsobem. Vzniklá "vlásnička" na zakončení 3' prvního řetězce cDNA se odstraní působením S1 nukleázy, tak jak bylo uvedeno ve svrchu uvedených publikacích Leonga a další, a Ullricha A. a dalších. Tato cDNA s dvojitým řetězcem se čistí extrakcí fenolem, chromatografií na Sephadexu G-50 a srážením ethanolem. Pak se naváže na zakončení 3'- ještě dCMP při použití dCTP a terminální transferázy, tak jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Roychoudhury a další.

Plasmid pBR322 se rozštěpí Pst I endonukleázou a naváže se dGMP svrchu uvedeným způsobem s tím rozdílem, se užije dGTP místo dCTP. 50 ng plasmidu pBR322 s dG po štěpení Pst I a 20 ng cDNA s dvojitým řetězcem po navázání dC se naváže v 50 µl reakční směsi způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Cooka a dalších.

Transformace *Escherichia coli* chi 1776 působením plasmidu se provádí následujícím způsobem. *Escherichia coli* chi 1776 se k získání propustnosti pro DNA inkubuje v 75 mM chloridu vápenatého, 5 mM chloridu hořečnatého, 10 mM tris-puftru o pH 7,5 po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Plasmid a bakterie se inkubují 60 minut při teplotě 4 °C a pak 2 minuty při teplotě 41 °C. Transformované kolonie se podrobí výběru na odolnost proti tetracyklinu. Přítomnost klonované DNA se stanoví hybridizací kolonií na čerstvě připravené cDNA, značené ^{32}P , z hypofýz skotu, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Grunsteina a Hognesse. Plasmidová DNA se připraví z vybraných kolonií, rozštěpí se enzymem Pst I, podrobí se elektroforéze na 1% agaróze, barví ethidiumbromidem a pak se přenesse na nitrocelulózové filtry způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Southernově. Přítomnost sledu pro růstový hormon v přenesené DNA se stanoví hybridizací na klonovaný růstový hormon krysy s plnou délkou cDNA tak, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci (Seeburga P. H. a dalších) a podrobí se značení (Maniatis, R. a další), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1184 (1975). Jeden z klonů který byl takto získán, byl označen pBP348. Včleněná část obsahuje 831 párů bází.

Příklad 2

Analýza sledu cDNA

Plasmid pBP348 se rozštěpí enzymem Pst I a fosfát na zakončení 5' fragmentů DNA se odstraní alkalickou fosfatázou a nahradí se značením ^{32}P -fosfátem při použití polynukleotidkinázy. Následujícím štěpením celou řadou dalších restričních endonukleáz, elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, barvením a autoradiografií svazků DNA se získá mapa restričních míst klonované DNA. Pak se získá větší množství pBP348 a opět se provádí štěpení Pst I, Pvu II nebo Sau 3A, ke značení se užije $\gamma^{32}\text{P}/\text{ATP}$ a polynukleotidkinázy a pak se získaný materiál štěpí dalšími enzymy, čímž se získají fragmenty DNA, značené pouze na jednom konci. Tyto fragmenty se získají elucí z polyakrylamidového gelu a pak se sledují způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Cook a další a v publikaci Maxam A. M. a Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1560 (1977). Sled, který má být včleněn, je znázorněn na obr. 1 spolu s odpovídajícím sledem aminokyselin, pro nějž je kódem uvedený řetězec, to jest řetězec, který svým sledem odpovídá sledu odpovídající mRNA.

Směr odečítání je možno rozeznat tak, že ve včleněné části chybí kodony pro zastavení činnosti. Polohy aminokyselin jsou číslovány od aminokyseliny, která má volnou aminoskupinu v růstovém hormonu skotu, načež se postupuje v kladném směru až do terminální karboxylové skupiny a v negativním směru k prvnímu kodonu AUG, o němž se předpokládá, že je signálem pro počátek translace. Stejně jako je tomu v případě dalších hormonů, je po translaci zapotřebí růstový hormon dále zpracovat. Translaci mRNA pro růstový hormon se získá prekurzor růstového hormonu s obsahem signálního peptidu, který může být uvolněn při přechodu do endoplasmatického prostoru.

Příklad 3

(A) Opakuje se postup, uvedený v příkladu 1, při použití plasmidu pBR 315 místo plasmidu pBR322. Všechny podmínky zůstávají stejné včetně výběru rekombinantních klonů. Včleněná část se odstraní a analyzuje stejným způsobem, jako v příkladu 2, čímž se získá DNA o 831 párech bází se sledem, uvedeným na obr. 1.

(B) Opakuje se postup podle příkladu 1, avšak užije se plasmidu pBR316 místo plasmidu pBR322. Všechny podmínky jsou jinak stejné jako v příkladu 1. Odstranění a analýza včleněné části se provádí způsobem podle příkladu 2, čímž se získá DNA se sledem, znázorněným na obr.1.

Příklad 4

Pro postup podle tohoto příkladu se připraví cDNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu, způsobem podle příkladu 1. Všechny řetězce, navázané na volná zakončení v průběhu tohoto postupu, se připravují způsobem, popsáným v publikaci Scheller R. H. a další, Science 196, 177 (1977). Restriktivní endonukleázy, použité při provádění tohoto postupu, jsou běžně dodávány od New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, přičemž bylo užito optimálních podmínek, doručených dodavatelem. Transformace *Escherichia coli* chil776 se provádí způsobem, uvedeným v příkladu 1.

(A) Na cDNA se po její výrobě podle příkladu 1 naváží v místě působení enzymu Hind III sledy 5' - CCAAGCTTGC -3' při použití T4 DNA ligázy způsobem, popsáným v publikaci Valenzuela P. a další, Nature 280, 815 (1979). Po navázání se produkt podrobí působení enzymu Hind III nebo Hsu I a pak se postupuje způsobem, uvedeným v publikaci Ullrich A. a další, Science 196, 1313 (1977). Plasmid pBR322 se rozštěpí v místě pro působení enzymu Hind III působením enzymu Hind III nebo Hsu I, načež se zpracuje působením alkalické fosfatázy, tak jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Ullricha A. a dalších. Po vysrážení ethanolem se rozštěpený plasmid pBR322 naváže na cDNA s obsahem zakončení po působení enzymu Hind III, tak jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Ullricha A. a dalších. Při použití této směsi se transformuje *Escherichia coli* chil776 a transformované kolonie se podrobí výběru na citlivost na tetracyklin. Přítomnost klonované DNA se prokazuje způsobem podle příkladu 1. Kolonie s obsahem včleněné části se zpracovávají tak, že se tato část odstraní působením enzymu Hind III a Hsu I a provádí se analýza stejným způsobem, jako v příkladu 2. Včleněná část obsahuje přibližně 830 párů bází a má sled, uvedený na obr. 1.

(B) Opakuje se způsob podle příkladu 4(A), avšak užije se několika vektorů místo plasmidu pBR322. Užije se například plasmidů pS101, pMB9, pBR313, pBR315 a pBR316 místo plasmidu pBR322. Všechny podmínky včetně volby rekombinantních klonů jsou jinak stejné jako v odstavci A. Pro všechny plasmidy byly získány stejné výsledky, to znamená, že v každém případě byl získán rekombinantní plasmid, obsahující včleněnou část se sledem, uvedeným na obr. 1.

(C) Opakuje se postup podle příkladu 4(A), avšak užije se několik dalších restričních endonukleáz a jiných vazných řetězců. Užijí se například vazné řetězce v místech Sal I a Bam HI místo Hind III. Sled těchto řetězců je 5' - GGTCGACC - 3' a 5' - CCGGATCCGG - 3'. V případě, že se užije první z řetězců, provádí se štěpení endonukleázou Sal I, a v případě, že se užije druhého řetězce, užije se endonukleázy Bam HI. Další podmínky včetně výběru rekombinantních klonů jsou jinak totožné jako v odstavci 4(A). V případě obou řetězců a obou restričních endonukleáz bylo dosaženo týchž výsledků.

(D) Opakuje se způsob podle odstavce 4(C), přičemž se užije plasmidů pSC101, pMB9, pBR313, pBR315 a pBR316 místo plasmidu pBR322. Všechny podmínky jsou jinak stejné jako v odstavci 4(C) a byly také získány stejné výsledky, to znamená, že v každém případě byl včleněn sled, který je znázorněn na obr. 1.

(E) Opakuje se postup podle odstavce 4(A) s tím rozdílem, že se v místě působení Eco RI užije vazný řetězec se sledem 5' - CCGAATTCGG - 3' místo vazného řetězce v místě působení Hind III (Hsu I). Všechny podmínky jsou jinak stejné s tím rozdílem, že transformované kolonie nejsou podrobeny výběru podle citlivosti na tetracyklin. Přítomnost klonované DNA se zjišťuje stejným způsobem jako v příkladu 1. Získá se rekombinantní klon, který obsahuje včleněnou část, znázorněnou na obr. 1.

(F) Opakuje se postup podle odstavce 4(E) s tím rozdílem, že se užijí plasmidy pSC101, pMB9, pBR313 a pBR315 místo plasmidu pBR322. Jinak se užije stejných podmínek jako v odstavci 4(E) a pro každý plasmid se také dosáhne stejných výsledků.

(G) Opakuje se způsob podle příkladu 4(A), avšak užije se vazného řetězce 5' GCTGCAGC - 3' v místě pro působení restričního enzymu Pst I, který se užije místo vazného řetězce v místě Hind III (Hsu I). Jinak se užije stejných podmínek s tím rozdílem, že výběr rekombinantních klonů se provádí způsobem podle příkladu 1. Tímto způsobem se získá rekombinantní klon, jehož sled odpovídá sledu, znázorněnému na obr. 1.

(H) Opakuje se postup podle příkladu 4(G) s tím rozdílem, že se užijí plasmidy pBR315 a pBR316 místo plasmidu pBR322. Jinak se užijí stejné podmínky jako v příkladu 4(G) a dosáhne se týchž výsledků.

(I) Opakují se příklady 1, 3(A), 3(B), a 4(A) až (H) s tím rozdílem, že se užije *Escherichia coli* RRI nebo *Escherichia coli* HB101 místo *Escherichia coli* chil776. Všechny podmínky jsou jinak stejné a bylo také dosaženo stejných výsledků.

Příklad 5

V tomto případě byla cDNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu, připravena stejným způsobem jako v příkladu 1. Do místa pro působení enzymu Eco RI byly navázány řetězce způsobem, který byl popsán ve svrchu uvedené publikaci Valenzuela P. a další, a tyto řetězce byly navázány také na cDNA,

načež bylo provedeno štěpení enzymem EcoRI, tak jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Ullricha A. a dalších.

(A) Jako vektor pro přenos byl užit Charon 16A DNA, připravený podle svrchu uvedené publikace Blattnera a dalších. Kohezivní zakončení byla spojena inkubací po dobu 60 minut při teplotě 42 °C v 0,1 M tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,0 za přítomnosti 10 mM chloridu hořečnatého. Vektor byl rozštěpen v místě působení Eco RI endonukleázou Eco RI a získaná směs byla podrobena působení alkalické fosfatázy podle svrchu uvedené publikace Ullricha A. a dalších. Po srážení ethanolem byl vektor, zpracovaný působením fosfatázy, přidán k cDNA s obsahem zakončení pro působení enzymu Eco RI v molárním poměru 2 mol vektoru na 1 mol cDNA. Směs se naváže působením T4 DNA ligázy podle svrchu uvedené publikace Ullricha A. a dalších. Výsledná směs se přímo přidá k suspenzi buněk *Escherichia coli* chil776, připravené způsobem podle příkladu 1, a transformace se rovněž provádí způsobem, popsaným podle příkladu 1. Rekombinantní fágy se izolují a pěstují na Lac^- bakteriích na plotnách s obsahem 5-chlor-4-brom-3-indolyl- β -D-galaktosidu (X6) v koncentraci 80 $\mu\text{g/ml}$, a rekombinantní fágy s obsahem cDNA, včleněné do místa pro působení Eco RI v plasmidu Charon 16A, se podrobí výběru podle produkce bezbarvých plaků. Zvolený rekombinantní plasmid se izoluje a podrobí působení přebytku endonukleázy Eco RI a výsledná směs se analyzuje způsobem podle příkladu 2. Získá se DNA o přibližně 830 párech bází se sledem, uvedeným na obr.1. Je také možno postupovat tak, že se získaná směs přímo užije in vitro k získání rekombinantních fágů způsobem, popsaným v publikaci Sternberg N. a další, *Gene* 1, 255 (1977). Rekombinantní fágy je také možno sledovat podle hybridizace plaků in situ způsobem, popsaným v publikaci Benton W. D. a Davis R. W., *Science* 196, 180 (1977).

(B) Charon 3A nebo 4A DNA, připravený podle svrchu uvedené publikace Blattnera a dalších, se užije jako vektor pro přenos místo Charonu 16A DNA. Všechny podmínky jsou jinak stejné jako pro Charon 16A DNA. Výběr rekombinantních fágů se provádí

(a) pěstováním na Lac^+ bakteriích na plotnách s obsahem X6 s následnou izolací bezbarvých plaků a hybridizací nebo natrávením restriční endonukleázou podle svrchu uvedené Blattnerovy publikace. Včleněná část se odstraní svrchu uvedeným způsobem, čímž se získá DNA o přibližně 830 párech bází se sledem, znázorněným na obr.1.

(C) λ_{gt} WES. λ_{B} DNA, podle publikace Tiemier a dalších, tak jak byla svrchu uvedena, se užije jako vektor pro přenos místo Charonu 16A. Všechny podmínky jsou jinak totožné jako pro Charon 16A. Selektce rekombinantních fágů se provede hybridizací podle svrchu uvedené publikace Benttona a Davise. Včleněná část se odstraní svrchu uvedeným způsobem, čímž se získá DNA o přibližně 830 párech bází se sledem, znázorněným na obr.1.

(D) Opakují se příklady 5(A) až (C), avšak užije se *Escherichia coli* RPI, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* DP50 nebo *Escherichia coli* DP50SupF místo *Escherichia coli* chil776. Všechny podmínky jsou jinak totožné a byly získány také totožné výsledky.

Příklad 6

V tomto příkladě byla cDNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu skotu připravena rovněž způsobem podle příkladu 1. Byly užity vazné řetězce v místě Hind III a cDNA byla štěpena enzymy Hind III nebo Hsu I podle příkladu 4(A).

Plasmid pC194, izolovaný ze *Staphylococcus aureus* způsobem podle svrhu uvedené publikace Ehrliche S. D., se užije jako vektor pro přenos. Plasmid pC194 se rozštěpí v místě působení Hind III enzymem Hind III nebo Hsu I a pak se zpracovává působením alkalické fosfatázy podle svrhu uvedené publikace Ullricha A. a dalších. Pak se cDNA se zakončeními v místě působení Hind III naváže na rozštěpený pC194 podle svrhu uvedené publikace Ullricha A. a dalších. Indukce *B. subtilis* RUB331 se provádí způsobem podle publikací Sgaramella V. a další J. Mol. Biol., 105, 587 (1976) a Borenstein S. a Ephrati-Elizue E., J. Mol. Biol., 45, 137 (1969). Transformace *B. subtilis* RUB331 se provádí směsí, popsanou ve svrhu uvedené publikaci Sgaramella a další a Borensteina a dalších. Buněčná suspenze se nanáší přímo na L plotny s obsahem 3 µg chloramfenikolu. Po selekci se izolují rekombinanty a podrobí se působení enzymu Hind III a získaný materiál se analyzuje jako v příkladu 2. Tímto způsobem se získá DNA o přibližně 830 párech bází se sledem, znázorněným na obr. 1.

Příklad 7

Syntéza cDNA, která je kódem pro růstový hormon skotu

(A) Plasmid pBR348 se podrobí působení endonukleázy Hae II, čímž se získá fragment o 1600 párech bází. Jedno místo pro působení Hae II se nachází uvnitř včleněné cDNA, která je kódem pro prekurzor růstového hormonu, a druhé místo se nachází v místě pBR322 plasmidu. Natrávením se získá následující materiál:

+1 +2

5' - C TTC.....3'
3' - G CGG AAG.....5'

Růstový hormon skotu může začínat buď ala v poloze +1, nebo phe v poloze +2 při zakončení NH₂ (Dayhoff a další, viz svrhu), takže je možno se pokusit o doplnění kodonu ala nebo o jeho úplné odstranění. Úplné odstranění je možno dosáhnout inkubací DNA s dATP a Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I, protože první bázi kodonu phe v poloze +2 (v řetězci 3'→5') je A. Touto reakcí se získá následující materiál:

+1 +2

5' - C TTC 3'
3' - AAG 5'

DNA se extrahuje fenolem a vysráží. Přebytek dATP a rozložených bází se odstraní chromatografií na Sephadexu G-50. Zbývajících uhlíkový atom na zakončení 5' v původní poloze +1 v místě kodonu pro ala se pak odstraní působením S1 nukleázy způsobem, popsaným

v publikaci Shine a další, Nature 285, 456 (1980). Tímto způsobem se získá následující materiál:

+2

5' - TTC 3'
3' - AAG 5'

(B) Opakuje se postup podle příkladu 7(A) tak, že se sled desoxynukleotidů, který je kódem pro prekursor růstového hormonu skotu, odstraní z vektorů pro přenos, získaných podle příkladů 3, 4, 5 a 6, při použití příslušných restrikčních enzymů před působením Hae II. Použité vektory a restrikční enzymy jsou uvedeny v následující tabulce 3.

Tabulka 3

Restrikční enzym	Vektor pro přenos (příklad)
Pst I	3A, 3B, 4G, 4H
Hind III	4A, 4B, 6
Sal I	4C, 4D
Bam HI	4C, 4D
Eco RI	4E, 4F, 5A, 5B, 5C

Po natrávení příslušným restrikčním enzymem se sled pro prekursor růstového hormonu izoluje elektroforézou na gelu a pak se zpracovává způsobem podle příkladu 7(A), získají se tytéž výsledky.

(C) opakuje se postup podle příkladu 7(A) a 7(B) při použití T4 DNA polymerázy nebo 3'-5' exonukleázy místo Klenowova fragmentu DNA polymerázy I. Všechny ostatní podmínky jsou tytéž a v každém případě se také získá identický sled, který je fragmentem růstového hormonu skotu.

Příklad 8

(A) Působením enzymu Hae II podle příkladu 7(A) nebo 7(B) se získá fragment růstového hormonu skotu

+1 +2

5' - C TTC 3'
3' - G CGG AAG 5'

Tento fragment je možno doplnit tak, že se inkubuje s dATP, dGTP, dCTP, dTTP a Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I. Touto reakcí se získá následující materiál:

+1 +2

5' - G GCC TTC 3'
 3' - G CGG AAG 5'

DNA se extrahuje fenolem a vysráží. Získaný sled se pak inkubuje s Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I za přítomnosti dCTP. Sled se pak podrobí působení S1 nukleázy podle publikace Shine a dalších, Nature 285, 456 (1980), čímž se získá následující materiál:

5' - GCC TTC 3'
 3' - CGG AAG 5'.

(B) Opakuje se postup podle příkladu 8(A) s tím rozdílem, že se užije T4 DNA polymeráza nebo 3'-5' exonukleáza místo Klenowova fragmentu v druhém inkubačním stupni, to jest za přítomnosti dCTP. Všechny ostatní podmínky jsou totožné a v každém případě se také získá stejný sled pro růstový hormon skotu.

Příklad 9

Desoxynukleotidový sled, který je kódem pro růstový hormon skotu, se včlení do vektoru pro přenos svrchu popsáním způsobem pro sled, který je kódem pro prekursor růstového hormonu.

(A) Opakují se příklady 1, 3(A), 3(B), 4(A), až (I), 5(A) až (D) a 6, přičemž se užije DNA, připravená podle příkladů 7(A), 7(B) nebo 7(C) místo DNA, která je kódem pro prekursor růstového hormonu skotu. Všechny další podmínky jsou totožné. DNA se odstraní natrávením příslušným restričním enzymem, například jako v tabulce 3, a analyzuje se podle příkladu 2. DNA, jejíž sled začíná kodonem Phe v poloze 2 a končí sledem, znázorněným na obr. 1, je výsledným produktem ve všech případech.

(B) Opakuje se způsob podle příkladu 1, 3(A), 3(B), 4(A) až (I), 5(A) až 5(B) a 6, přičemž se užije DNA, připravená podle příkladů 8(A) nebo 8(B), místo DNA, která je kódem pro prekursor růstového hormonu skotu. Všechny ostatní podmínky jsou totožné. DNA se odstraní působením příslušného restričního enzymu, tak jak jsou uvedeny například v tabulce 3, a analyzuje se způsobem podle příkladu 2. Ve všech případech se získá DNA, jejíž sled začíná kodonem pro Ala v poloze 1 a pokračuje sledem, znázorněným na obr.1.

Příklad 10

Expresí růstového hormonu skotu

Růstový hormon skotu může být doveden k expresi jakýmkoli ze svrchu popsáných způsobů.

(A) Expresí růstového hormonu skotu ve formě prekursoru jako složené bílkoviny byla provedena radioimunologicky a při použití minibuněk. Při radioimunologickém pokusu byla *Escherichia coli* chil776 s obsahem pBP348, nebo *Escherichia coli* s obsahem pBP322

jako kontrola pěstována v živném prostředí a oddělena odstředěním. Buňky byly znovu uvedeny v suspenzi a rozrušeny růstovým hormonem ovce s radioaktivním značením s následným přidáním protilátky proti růstovému hormonu ovce nebo skotu. Imunologický komplex byl vysrážen a jeho přítomnost byla měřena radioaktivním způsobem. Tento pokus prokázal, že si složená bílkovina uchovává aspoň z určité části imunologickou účinnost růstového hormonu skotu. Aby bylo možno dále zkoumat vlastnosti složené bílkoviny, byl proveden pokus na minibunčkách způsobem, popsáným v publikaci Meagher R. B. a další, Cell, 10 521 (1977). Na obr.2 jsou znázorněny pásy, získané při elektroforéze na gelu při použití materiálu z minibuněk *Escherichia coli* chil776. Pás (a) byl získán z buněk, transformovaných pBP348. Pás (b) byl získán z buněk, transformovaných pBR322. Pás (c) je užit pro označení molekulové hmotnosti. (A) označuje složenou bílkovinu při použití β -laktamázy a prekursoru růstového hormonu skotu. (B) označuje prekursor laktamázy a (C) označuje β -laktamázu. Tento pokus prokazuje, že pBP348 vytváří složenou bílkovinu, která obsahuje 183 aminokyselin β -laktamázy, 217 aminokyselin prekursoru růstového hormonu skotu a malý počet spojujících aminokyselin, které jsou kódem pro oblast 5', k jejíž translaci za běžných podmínek nedochází. Celková molekulová hmotnost je přibližně 45 000 a je v souhlasu s předpokládanou molekulovou hmotností hybridní bílkoviny.

(B) Pro přímou expresi prekursoru růstového hormonu skotu se včleněná DNA nejprve oddělí z pBP348 částečným působením endonukleázy Pst I a čistí preparativní elektroforézou na gelu. 15 μ g takto čištěné DNA se pak modifikuje tak, že se tato DNA uvede v suspenzi ve vodě, k níž se přidá koncentrovaný roztok solí, takže výsledná směs obsahuje 70 mM tris-pufry o pH 8,8, 70 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu a 13,75 jednotek 74 DNA polymerázy v celkovém objemu 250 μ l. Reakční směs se inkubuje několik minut při teplotě 37 °C a pak se přidá dATP do koncentrace 50 mM k ukončení endonukleolytického natrávení následujícího adeninového zbytku. Po 30 sekundách další inkubace se enzym inaktivuje teplem při teplotě 65 °C na 5 minut. Postup se ještě dvakrát opakuje, v prvním případě se užije dCTP místo dATP a v dalším případě se užije dTTP. Získaná DNA se izoluje vysrážením ethanolem. Působením S1 nukleázy se získají požadovaná zakončení podle svrchu uvedené publikace Ullricha A. a dalších. Tímto způsobem se získá molekula DNA, která je ukončena v poloze -26. U těchto molekul dojde k translaci v případě, že se včlení do vektoru pro expresi s místem včlenění 3 až 11 nukleotidů od místa pro vazbu ribosomálního sledu v jednotce, určené k expresi.

Vektor pro přímou expresi se získá modifikací plasmidu ptrpE30 tak, že se odstraní nukleotidy 23 až 29 při použití T4 DNA polymerázy a S1 nukleázy svrchu uvedeným způsobem.

Modifikovaná cDNA a modifikovaný vektor pro expresi se opatří specifickým vazným řetězcem, který na jednom svém zakončení obsahuje sled 5' - CCGGATCCGG - 3', a na druhém zakončení obsahuje komplementární sled při použití DNA ligázy podle svrchu uvedené publikace Valenzuely. V důsledku toho vznikají restriční místa, citlivá na endonukleázu Bam HI, tato místa jsou zavedena k usnadnění inserce. Včlenění se provádí podle svrchu uvedené publikace Ullricha A. a dalších. Hostitelská bakterie *Escherichia coli* HB101, RRI nebo chil776 se transformuje rekombinantním vektorem,

který nese včleněnou modifikovanou oblast, která je kódem pro prekursor růstového hormonu, a transformované kolonie se podrobí výběru na odolnost k ampicilinu. Pro další analýzu se vybere transformovaná kolonie, která se označí ptrpE30/bGH.

Bakteriální buňky, transformované ptrpE30/bGH, se pěstují ve standardním minimálním prostředí M9, které se doplní Leu, Pro, vitamínem B1 a ampicilinem, při teplotě 37 °C. V časně fázi log se trp operon indukuje přidáním kyseliny β -indolylakrylové v množství 30 μ g/ml. U kontrolních kultur se indukce neprovádí. Po dalších 3 hodinách růstu se 1,5 ml buněk radioaktivně značí přidáním 20 μ Ci 35 S-L-Met a buňky se inkubují ještě 10 minut, načež se oddělí odstředěním a promyjí, načež se uvedou v suspenzi ve 250 μ l pufru, který obsahuje 10 objemových % glykolu, 5 objemových % β -merkaptioethanolu a 2,3 % (hmotnostní/objemová %) SDS v 0,0625 M tris-pufu o pH 6,8. Suspenze se 5 minut vaří a pak se nanese na SDS polyakrylamidový gel o koncentraci 10 % (hmotnostní/objemová %) a podrobí se frakcionaci elektroforézou. Pásky bílkovin se označí autoradiograficky. Tímto způsobem je možno prokázat pás nové bílkoviny o přibližně 24 000 daltonů, který není možno pozorovat u kultur bez indukce nebo bez transformace.

Prekursor růstového hormonu skotu se čistí běžným způsobem, například filtrací na gelu, chromatografií na iontoměniči, afinitní chromatografií nebo technikami, které využívají různé rozpustnosti. Prekursor růstového hormonu je možno převést na růstový hormon následujícím způsobem, který byl popsán ve svrchu uvedené publikaci Jacksona a dalších.

(C) Specifický vazný řetězec se sledem 5' - CCGGATCCGGATG - 3' na jednom řetězci a s doplňkovým sledem na druhém konci se naváže na DNA, která je kódem pro růstový hormon skotu, připravený podle příkladu 7(A) až (C) a 8(A) až (B). Tato modifikovaná DNA se pak včlení do modifikovaného plasmidu ptrpE30 způsobem, popsaným v příkladu 10(B). Hostitelská bakterie se transformuje a pěstuje a výsledný růstový hormon skotu se čistí způsobem, popsaným v příkladu 10(B).

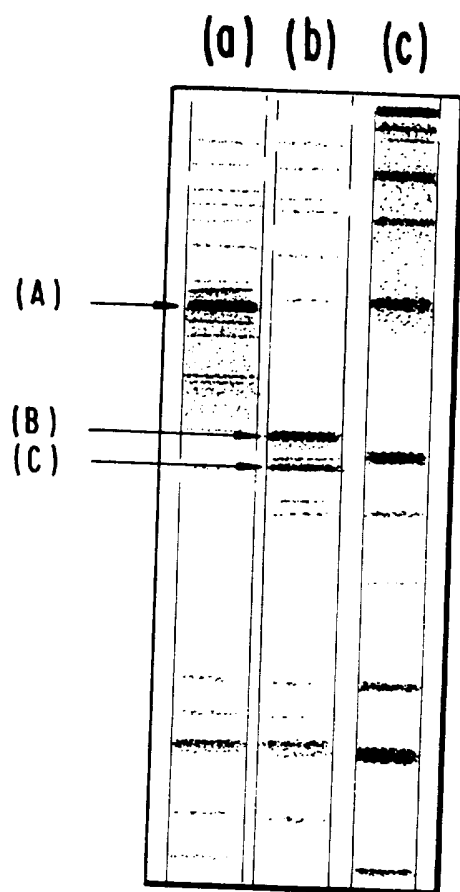
Vynález byl popsán ve spojení se specifickým provedením, je však zřejmé, že jsou možné další modifikace. Je zřejmé, že do oboru vynálezu spadají také jakékoli variace nebo adaptace uvedeného způsobu v případě, že bude zachován princip způsobu podle vynálezu a variace se budou týkat pouze známých nebo běžných reakcí.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby vektoru pro přenos, obsahujícího kódovou DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že se první DNA, obsahující kódový
řetězec pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu,
uvede do styku s druhou DNA, obsahující linearizovaný plasmid
hostitele, za vzniku vektoru pro přenos, který se pak izoluje.
2. Molekula DNA, obsahující kódové řetězce pro aminokyseliny 2 až
191 růstového hormonu skotu.
3. Molekula DNA podle nároku 2, obsahující kódové řetězce pro
prekurzor růstového hormonu skotu.
4. Rekombinantní systém pro expresi kódové DNA pro aminokyseliny
2 až 191 růstového hormonu skotu v hostitelské buňce,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kódovou DNA
pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu, operativně
vázanou na řídicí řetězce, kompatibilní s hostitelskou buňkou.
5. Rekombinantní systém pro expresi podle nároku 4, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je uložen v plasmidu.
6. Rekombinantní systém pro expresi podle nároku 4, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že kódová DNA pro aminokyseliny
2 až 191 růstového hormonu skotu obsahuje kódové řetězce pro
další aminokyseliny a je kódem pro precursor růstového hormonu
skotu.
7. Rekombinantní systém pro expresi podle nároku 6, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je uložen v plasmidu.
8. Způsob výroby bílkoviny, obsahující aminokyseliny 2 až 191
růstového hormonu skotu, v y z n a č u j í c í s e t í m,
že se pěstují buňky, obsahující systém, který v hostitelské
buňce ovlivňuje expresi kódové DNA pro aminokyseliny 2 až 191
růstového hormonu skotu, přičemž tento systém je tvořen kódo-
vou DNA pro aminokyseliny 2 až 191 růstového hormonu skotu,
operativně vázanou na řídicí řetězce, kompatibilní s buňkou
hostitele, a vzniklá bílkovina se z kultury izoluje.
9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m,
že kódová DNA pro aminokyselinu 2 až 191 růstového hormonu
skotu obsahuje kódové řetězce pro další aminokyseliny a je
kódem pro precursor růstového hormonu skotu.

2 výkresy

-26 met met ala ala gly pro arg thr ser leu leu ala phe ala leu
 -20 ACCGGCTCAGGGTCCGTGACGCTCACCAGCT ATG ATG GCT GCA GGC CCC CGG ACC TCC CTG CTC CTG GCT TTC GCC CTG
 1 leu cys leu pro trp thr gln val val gly ala phe pro ala met ser leu ser gly leu phe ala asn ala
 10 CTC TGC CTG CCC TGG ACT CAG CAG GTG GGC GCC TTC CCA GCC ATG TCC TTT GGC CTG TTT GCC AAC GCT
 20 val leu arg ala gln his leu his gln leu ala ala asp thr phe lys glu phe glu arg thr tyr ile pro
 30 GTG CTC CGG GCT CAG CAC CAG CTG CAC CAG CTG GCT GCT GCT GCT AAA GAG TTT GAG CGT ACC TAC ATC CCG
 40 glu gly gln arg tyr ser ile gln asn thr gln val ala phe cys phe ser glu thr ile pro ala pro thr
 50 GAG GGA CAG AGA TAC TCC ATC CAG AAC ACC CAG GTT GCC TTC TGC TCC GAA ACC ATC CCG GCC CCC ACG
 60 gly lys asn glu ala gln gln lys ser asp leu leu arg ile ser leu leu ile gln ser trp
 70 GGC AAG AAT GAG GCC CAG CAG AAA TCA GAC TTG GAG CTG CTT CGC ATC TCA CTG CTC ATC CAG TCG TGG
 80 leu gly pro leu gln phe leu gln phe val phe gly thr ser asp arg val tyr
 90 CTT GGG CCC CTG CAG TTT CTC AGC AGC AGA GTC TTC ACC AAC AGC TTG GTG TTT GGC ACC TCG GAC CGT GTC TAT
 100 glu lys leu lys asp leu glu glu gly ile leu ala leu met arg glu leu glu asp gly thr pro arg ala
 110 GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAG GAA GGC ATC TTG GCC CTG ATG CGG GAG CTG GAA GAT GGC ACC CCC CGG GCT
 120 gly gln ile leu lys gln thr tyr asp lys phe asp thr asn met arg ser asp ala leu leu lys asn
 130 GGG CAG ATC CTC AAG CAG ACC TAT GAC AAA TTT GAC ACA AAC ATG CGC AGT GAC GAC GCG CTG CTC AAG AAC
 140 tyr gln leu leu ser cys phe arg lys asp leu his lys thr glu thr tyr leu arg val met lys cys arg
 150 TAC GGT CTG CTC TCC TGC TTC CGG AAG GAC CTG CAT AAG ACG GAG ACG TAC CTG AGG GTC ATG AAG TGC CGC
 160 arg phe gly glu ala ser cys ala phe AM
 170 CGC TTC GGG GAG GCC AGC TGT GCC TTC TAG TTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCGCTGCTTCTTACCCCTGGAAGG
 180 TGCCACTCCCACTGCTCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGC[poly A]



2

Konec dokumentu
