



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

227002
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

[22] Přihlášeno 26 05 78
[21] (PV 3435-78)

[32] [31] [33] Právo přednosti od 27 05 77
(801343), od 21 04 78 (898887) a od
26 04 78 (899002)
Spojené státy americké

[40] Zveřejněno 26 08 83
[45] Vydáno 15 06 86

[72]
Autor vynálezu

RUTTER WILLIAM J., GOODMAN HOWARD MICHAEL, ULLRICH AXEL,
SAN FRANCISCO, CALIFORNIA (Sp. st. a.), SHINE JOHN, CURTIN
(Austrálie), CHIRGWIN JOHN MITCHELL, PICTET RAYMOND LOUIS,
SEEBURG PETER HORST, SAN FRANCISCO, CALIFORNIA (Sp. st. a.)

[73]
Majitel patentu

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY,
CALIFORNIA (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby vektoru pro přenos DNA

1

Vynález se týká způsobu výroby vektoru pro přenos DNA, zejména izolace specifického sledu nukleotidů, který obsahuje genetický informační kód pro specifickou bílkovinu, syntézy DNA, která obsahuje tento specifický sled nukleotidů a přenosu této DNA na mikroorganismus, v němž je možno tuto DNA pomnožit. Vynález se dále týká izolace inzulinového genu, čištění těchto látek, jejich přenosu a jejich množení v mikrobiálním hostiteli a zjištění jejich vlastností. Způsobem podle vynálezu je možno vyrobit celou řadu nových produktů. Tyto produkty v sobě zahrnují i rekombinantní plasmid, obsahující specifický sled nukleotidů, odvozený z vyššího organismu a nový mikroorganismus, který obsahuje jako část svého genetického seskupení specifický sled nukleotidů, odvozený od vyššího organismu.

V průběhu přihlášky jsou užívány zkratky, uvedené v následující tabulce:

DNA — kyselina desoxyribonukleová
RNA — kyselina ribonukleová
cDNA — komplementární DNA (enzymaticky syntetizovaná ze sledu mRNA)
mRNA — RNA účastnící se přenosu („messenger RNA“)
tRNA — přenesená RNA („transfer RNA“)
dATP — desoxyadenosintrifosfát

2

dGTP — desoxyguanosintrifosfát
dCTP — desoxycytidintrifosfát
A — adenin
T — thymin
G — guanin
C — cytosin
Tris — 2-amino-2-hydroxyethyl-1,3-propanediol
EDTA — kyselina ethylendiamintetraoctová
ATP — adenosintrifosfát
TTP — thymidintrifosfát

Biologický význam základní sekvence DNA spočívá v tom, že v něm je uložena genetická informace. Je známo, že sled bází v DNA se užívá jako kód, který určuje sled aminokyselin ve všech bílkovinách, které buňka vyrábí. Mimoto se část tohoto sledu užívá k regulačním účelům, zejména k řízení doby a množství výroby jednotlivých bílkovin. Povaha tohoto řízení je zatím jen částečně objasněna. Konečně se užívá sekvence bází v každém řetězci jako základ pro obnovování DNA, jakož i pro množení DNA, které doprovází každé buněčné dělení.

Způsob, jímž se základní informace o sledu bází v DNA užívá k určení sledu aminokyselin v bílkovinách je základním procesem, který je v širším smyslu univerzální pro všechny živé organismy. Bylo prokázáno

no, že každá aminokyselina, která se nachází v bílkovinách je určena jedním nebo větším počtem sledů trinukleotidů. Z toho vyplývá, že pro každou bílkovinu je možno zjistit odpovídající segment DNA, který obsahuje sekvenci tripletů, která odpovídá sledu aminokyselin v dané bílkovině. Genetický kód je znázorněn v následující tabulce.

Biologický způsob přeměny sekvence nukleotidů jako informace do sledu aminokyselin v první stupni spočívá v tom, že lokální segment DNA se sledem, který určuje strukturu bílkoviny, která má být vyrobena se nejprve změní ve svou kopii pomocí RNA. RNA je polynukleotid, který je podobný DNA s tím rozdílem, že ribóza je nahrazena desoxyribózou a je užito uracilu místo thyminu. Báze RNA se mohou dostat do týchž vztahů jako v DNA. V důsledku toho je možno vytvořit v RNA komplement ke sledu nukleotidů DNA. Takto modifikovaná RNA se nazývá mRNA, protože je intermediárním článkem mezi genetickou soustavou a soustavou pro syntézu bílkovin v buňce.

V buňce se užívá mRNA v komplexních procesech, včetně enzymů a organel, jejichž činnost dochází k syntéze určitého specifického sledu aminokyselin. Tento způsob se nazývá translací mRNA.

V řadě případů jsou nutné ještě další stupně, jichž je zapotřebí k přeměně syntetizovaného sledu aminokyselin na funkční bílkoviny. Jako příklad bude uveden inzulin.

Genetický kód

fenylalanin (Phe)	TTK
leucin (Leu)	XTY
isoleucin (Ile)	ATM
methionin (Met)	ATG
valin (Val)	GTL
serin (Ser)	ORS
prolin (Pro)	CCL
threonin (Thr)	ACL
alanin (Ala)	GCL
tyrosin (Tyr)	TAK
terminační signál	TAJ
terminační signál	TGA
histidin (His)	CAK
glutamin (Gln)	AAJ
asparagin (Asn)	AAK
lysin (Lys)	AAJ
kyselina asparagová (Asp)	GAK
kyselina glutamová (Glu)	CAJ
cystein (Cys)	TGK
tryptofan (Try)	TGG
arginin (Arg)	WGZ
glycin (Gly)	GGL

Klíč: Každá skupina tří písmen znamená trinukleotid DNA s 5' na levé straně a 3' na pravé straně. Jednotlivá písmena znamenají purinové nebo pyrimidinové zásady, které tvoří sled nukleotidů.

A =	adenin
G =	guanin
C =	cytosin
T =	thymin
X =	T nebo C, je-li Y a nebo G
X =	C, je-li Y, C nebo T
Y =	A, G, C nebo T, je-li X C
Y =	A nebo G, je-li X T
W =	C nebo A, je-li Z A nebo G
W =	C, je-li Z C nebo T
Z =	A, G, C nebo T, je-li W C
Z =	A nebo G, je-li W A
QR =	TC, je-li S A, G, C nebo T
QR =	AG, je-li S T nebo C
S =	A, G, C nebo T, je-li QR TC
S =	T nebo C, je-li QR AG
J =	A nebo G
K =	T nebo C
L =	A, T, C nebo G
M =	A, C nebo T

Místo pro působení enzymu Alu I — sled AG ↓ CT, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Alu I.

Místo pro působení enzymu Bam HI — sled G ↓ GATCC, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Bam HI.

Místo pro působení enzymu Bgl I — sled GCCNNN ↓ NGGC, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Bgl I (N znamená jakýkoliv nukleotid).

Místo pro působení enzymu Eco RI — sled G ↓ AATTC, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Eco RI.

Místo pro působení endonukleázy Eco RII — sled ↓ CCAGG nebo ↓ CCTGG, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Eco RII.

Místo pro působení endonukleázy Hae II — sled AGCGC ↓ T nebo AGCGC ↓ C nebo GGCGC ↓ T nebo GGCGC ← C, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Hae II.

Místo pro působení endonukleázy Hinc II — sled GTTAAC nebo GTCAAG nebo GTCGAC, specificky štěpený endonukleázou Hinc II.

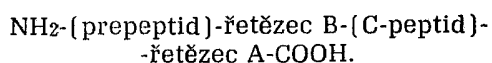
Místo pro působení endonukleázy Pst I — sled CTGCA ↓ G, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Pst I.

Místo pro působení endonukleázy Sal I — sled G ↓ TCGAC, specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Sal I.

Místo pro působení endonukleázy Sst I — sled GAGCT ↓ , specificky štěpený v místě šipky endonukleázou Sst I.

Bezprostředním prekursorem insulinu je polypeptid, nazývaný proinsulin, který obsahuje dva insulinové řetězce A a B, spojené mezi sebou dalším peptidem C, jak bylo popsáno v publikacích Steiner, D. F., Cunningham D., Spigelman L. a Eten B., Science

157, 697 (1967). V poslední době byly podány zprávy o tom, že počátečním translačním produktem insulinové mRNA není vlastní proinsulin, nýbrž preproinsulin, který obsahuje ještě více než 20 dalších aminokyselin na aminovém konci proinsulinu, jak bylo popsáno v publikaci Cahn S. J., Keim P. a Steiner F. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1964 (1976) a v publikaci Lomedico P. T. a Saunders G. F., *Nucl. Acids Res.* **3**, 381 (1976). Strukturu molekuly preproinsulinu je možno schematicky znázornit jako



V buňkách vyšších organismů, například obratlovců je možno nalézt mnohé bílkoviny, které mají lékařský význam nebo význam pro výzkum. Jde například o hormon insulinu, další hormony peptidové povahy, například růstový hormon, bílkoviny, které působí při řízení krevního tlaku a různé druhy enzymů s průmyslovým, lékařským nebo výzkumným významem. Je často velmi obtížné získat tyto bílkoviny v použitelném množství extrakcí z organismů, tento problém je zvláště tíživý v případě lidských bílkovin. Je proto nutné nalézt způsob, kterým by bylo možno tyto bílkoviny získat mimo původní organismus v dostatečném množství. V některých případech je možné získat příslušné buněčné linie, které je pak možno udržovat jako tkáňové kultury. Růst buněk ve tkáňových kulturách je však pomalý, růstové prostředí je velmi drahé, podmínky při pěstování musí být přesně zachovávány a výtěžky jsou poměrně nízké. Často je velmi obtížné udržet buněčnou linii s žádanými vlastnostmi.

Naproti tomu je možno snadno pěstovat mikroorganismus, například bakterie v chemicky definovaných živných prostředích. Fermentační způsoby jsou vysoce propracované a je možno je dobře řídit. Růst organismů je rychlý a je možno získat vysoké výtěžky. Mimoto jsou některé mikroorganismy přesně geneticky definovány a jsou tak vlastně jedněmi z nejlépe definovaných organismů vůbec.

Z těchto důvodů je vysoce žádoucí dosáhnout přenosu genetického kódu pro bílkoviny s lékařským významem z organismu, v němž se tato bílkovina běžně produkuje na příslušný mikroorganismus. Tímto způsobem by bylo možno dosáhnout toho, že uvedená bílkovina by byla produkována mikroorganismem řízených podmínek růstu, takže by bylo možno ji získat v žádaném množství. Je také možné tímto způsobem podstatně snížit náklady na výrobu této bílkoviny. Mimoto by možnost izolace a přenosu genetického sledu, který určuje produkci určité bílkoviny na mikroorganismus s dobře definovanou genetickou strukturou měla velkou cenu pro výzkum způsobu, kterým se řídí syntéza této bílkoviny a pro vý-

zkum chování této bílkoviny po syntéze. Mimoto by bylo možno izolovaný genetický sled měnit na kód pro různé bílkoviny se změnami léčebnými nebo funkčními vlastnostmi.

Způsobem podle vynálezu je možno uvedeného cíle dosáhnout. Způsob podle vynálezu v sobě zahrnuje celou řadu reakcí, včetně enzymaticky katalyzovaných reakcí. Povaha těchto enzymatických reakcí, pokud je známá, je současně vždy popsána.

Reverzní transkriptáza katalyzuje syntézu DNA za přítomnosti modifikované RNA, oligodesoxynukleotidu a čtyř desoxynukleosidtrifosfátů, dATP, dGTP, dCTP a TTP. Reakce začíná na nekovalentní vazbě olidodesoxynukleotidu, který se váže na polohu 3' mRNA, načež se postupně váží příslušné desoxynukleotidy, jak je to stanoveno při tvorbě nukleotidového sledu mRNA, a to na polohu 3' rostoucího řetězce. Výsledná molekula obsahuje původní RNA spolu s komplementárním DNA, která je vázána jednoduchou smyčkou DNA. Reverzní transkriptáza může rovněž katalyzovat podobnou reakci při použití modifikované DNA, v tomto případě je výsledným produktem sloučenina s dvěma řetězci DNA, které jsou spolu spojeny smyčkou, tvořenou jediným řetězcem DNA. Tyto postupy byly popsány v publikaci Aviv H. a Leder P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408 (1972) a Efstratiadis A., Kafatos, F. C., Maxam A. F. a Maniatis T., *Cell* **7**, 279 (1976).

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které jsou schopny hydrolyzovat fosfodiesterové vazby ve dvojitěm řetězci DNA, čímž dojde k přerušení kontinuity řetězce DNA. V případě, že DNA má formu uzavřené smyčky, mění se tato smyčka na lineární strukturu. Základní vlastností enzymu tohoto typu je skutečnost, že k hydrolytickému působení dochází pouze v místě, kde se nachází specifický sled nukleotidů. Toto místo má základní význam pro působení restrikční endonukleázy. Enzymy tohoto typu byly izolovány z různých zdrojů a byly charakterizovány místem svého působení v nukleotidovém řetězci.

Některé restrikční endonukleázy hydrolyzují fosfodiesterové vazby v obou řetězcích v tomtéž místě, jiné enzymy tohoto typu katalyzují hydrolýzu vazeb, které jsou od sebe odděleny pouze několika nukleotidy, takže vznikají volné části jednotlivých řetězců, které jsou odštěpeny od základní molekuly. Koncové části těchto řetězců se mohou doplňovat a mohou být užity k tomu, aby byla znovu vybudována hydrolyzovaná DNA. Protože každá DNA, kterou je možno vystavit štěpení tímto enzymem, musí obsahovat místo jeho působení, dochází ke vzniku stejných koncových částí, takže tímto způsobem je možno propojit heterologní řetězce DNA, které byly uvolněny svrhu uvedeným enzymem. Tyto postupy byly popsány v publikaci Roberts, R. J., *Crit. Rev.*

Biochem. 4, 123 (1976). Místa, v nichž uvedené enzymy mohou působit, se přirozeně vyskytují poměrně vzácně, použitelnost těchto enzymů však byla zvýšena chemickou syntézou dvojitého řetězce oligonukleotidů, které nesou místa, vhodná pro působení enzymu. Tímto způsobem je možno spojit téměř jakýkoli segment DNA s jiným segmentem tak, že se prostě naváže další nukleotid, v němž se nachází místo vhodné pro působení restriční endonukleázy na některý konec molekuly a vzniklý produkt se pak podrobí hydrolýze příslušnou restriční endonukleázou, čímž vznikají odpovídající zakončení, jak bylo popsáno v publikacích Heyneker H. L., Shine J., Goodman H. M., Boyer H. W., Rosenberg J., Dickerson R. E., Narang S. A., Itakura K., Lin S. a Riggs A. D., Nature 263, 748 (1976) a Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D. a Itakura K., Science 196, 177 (1977).

Sl-endonukleáza je enzym, který vysoce specificky hydrolýzuje fosfodiesterové vazby v DNA s jednoduchým řetězcem nebo jednoduché kličky DNA, která jinak obsahuje dva řetězce, jak bylo popsáno v publikaci Vogt, V. M., Eur. J. Biochem. 33, 192 (1973).

DNA ligáza je enzym, který je schopen katalyzovat tvorbu fosfodiesterové vazby mezi dvěma segmenty DNA s 5' fosfátem a 3' hydroxylovou skupinou, tak jak se mohou vytvořit ze dvou fragmentů DNA. Normální funkcí tohoto enzymu je patrně připojit jednoduchý řetězec nebo část řetězce v molekule DNA s dvěma řetězci. Za příslušných podmínek však může DNA ligáza katalyzovat spojení volných konců kovalentním způsobem, jak bylo popsáno v publikaci Sgaravella V., Van de Sande J. H., a Khorana H. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1468 (1970).

Alkalická fosfatáza je enzym, jehož obecnou schopností je buď hydrolýzovat estery fosfátu včetně 5'-terminálního fosfátu DNA.

Dalším stupněm, který je nutno popsat, je včlenění specifického fragmentu DNA do vektoru, jako je například plasmid. Plasmid je termín, kterým se nazývá autonomní replikační jednotka DNA, tak jak je ji možno nalézt v mikrobiální buňce, odlišná od genomu vlastní hostitelské buňky. Plasmid není geneticky vázán na chromozom hostitelské buňky. DNA plasmid existuje jako kruhová molekula s dvojitým řetězcem a molekulovou hmotností řádu několika miliónů i když hmotnost některých molekul je vyšší než 10^8 , molekuly tohoto typu obvykle tvoří pouze malý podíl celkové DNA buňky. DNA plasmid je možno obvykle oddělit od DNA buňky hostitele vzhledem k velkému rozdílu ve velikosti molekuly. Plasmidy se mohou množit nezávisle na rychlosti buněčného dělení buněk hostitele a v některých případech je jejich množení možno řídit změnami růstových podmínek. Přestože plasmid existuje ve formě uzavřeného kruhu, je možno uměle zavést do plasmidu segment

DNA, takže se vytvoří rekombinanta plasmidu s větší molekulou, aniž by byla ovlivněna rozmnožovací schopnost plasmidu nebo jiná jeho schopnost. Plasmid proto slouží jako vhodný vektor pro přenos segmentu DNA do buňky hostitele. Plasmidy, kterých se užívá při tvorbě rekombinant DNA typicky obsahují geny, které mohou být vhodné pro selekční účely, například geny na odolnost proti určitým látkám.

Aby bylo možno blíže popsat způsob podle vynálezu, bude tento způsob znázorněn na izolaci a přenosu insulinového genu krysy. Insulin byl zvolen pro svůj velký význam v klinickém lékařství a také proto, že jeho metabolismus a struktura jsou v základním výzkumu dobře propracovány. Popsaný postup je použitelný i pro izolaci insulinového genu jiných organismů včetně člověka každým odborníkem.

Insulin byl poprvé izolován v roce 1922. V současné době je použití tohoto hormonu pro léčbu cukrovky dobře známo. Běžným zdrojem insulinu je slinivka břišní skotu a vepře, přesto však vzniká nedostatek tohoto hormonu, protože množství lidí, nemocných cukrovkou na celém světě stoupá. Mimoto řada těchto nemocných postupem času vyvíjí alergické reakce proti hovězímu a vepřovému insulinu s příslušnými nepříznivými důsledky. Bylo by proto žádoucí získat v dostatečném množství lidský insulin. Výroba lidského insulinu v bakteriálních kulturách by byla dobrým řešením tohoto problému. Zatím však byly všechny pokusy o toto pěstování brzděny skutečností, že až dosud nebylo možno včlenit insulinový gen do bakteriální buňky. Způsob podle vynálezu toto včlenění umožňuje.

Možnost získat DNA se specifickým sledem, který je zároveň genetickým kódem pro specifickou bílkovinu, umožňuje modifikovat sled nukleotidu chemicky nebo biologicky tak, že produkovaná specifická bílkovina je rovněž modifikována. Tímto způsobem je například možno vyrobit modifikovaný insulin pro určité lékařské účely. Genetická schopnost vyrobit jakýkoli řetězec aminokyselin, vhodný pro včlenění do insulinového řetězce nebo mající základní funkční vlastnosti insulinu může být přenesena na mikroorganismus. Podobné podmínky je možno zajistit i v případě růstového hormonu.

Schopnost přenést genetický kód pro specifickou bílkovinu, nutnou pro normální metabolismus určitého vyššího organismu na mikroorganismus, například bakterii, otvírá možnost pěstovat tuto bílkovinu ve formě běžné kultury. Tím je také otevřena možnost získat větší množství těchto bílkovin a postupně je vůbec nahradit bílkovinami, produkovanými mikroorganismy v každém případě, kdy schopnost vyššího organismu k normální výrobě těchto bílkovin selhává. Tímto způsobem by například bylo možno

také vytvořit symbiotické vztahy mezi mikroorganismy, modifikovanými způsobem podle vynálezu a lidmi s akutním nebo chronickým onemocněním, přičemž geneticky podmíněný mikroorganismus by mohl být implantován nebo jiným způsobem spojen s lidským organismem za účelem kompenzace patologického metabolického stavu nemocného člověka.

Vynález se tedy týká způsobu izolace specifického sledu nukleotidů, který obsahuje genetickou informaci, syntézy DNA se specifickým sledem nukleotidů a přenosu této DNA na hostitelský mikroorganismus.

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin, takže se izolují buňky s obsahem mRNA, která je kódem pro insulin, z těchto buněk se extrahuje mRNA, načež se čistí a z této mRNA se syntetizuje cDNA za vzniku cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin a takto získaná cDNA se uvede v reakci s vektorem pro přenos DNA za vzniku vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin, vyznačující se tím, že se z buněk s obsahem mRNA, která je kódem pro insulin extrahuje tato mRNA, homogenizací buněk za přítomnosti inhibitoru ribonukleázy, který obsahuje guanidiniumthiokyanát a β -merkaptoethanol při pH 5,0 až 8,0, čímž se brání degradaci mRNA působením ribonukleázy, načež se cDNA uvede v reakci s vektorem pro přenos DNA ve dvou stupních, přičemž v prvním stupni se enzymaticky hydrolyzuje vektor pro přenos DNA působením restriční endonukleázy ze skupiny Hnd III nebo Hsu I za vzniku vektoru pro přenos DNA s reaktivními zakončeními, která jsou schopna vzájemného spojení nebo spojení s cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin a ve druhém stupni se enzymaticky spojí vektor pro přenos DNA a cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin při použití DNA-ligázy za přítomnosti adenosintrifosfátu a za vzniku vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin.

Příkladem přenosu DNA se specifickým sledem nukleotidů na bakterie může být gen kryšího preproinsulinu, gen kryšího růstového hormonu a gen lidského růstového hormonu. Je zřejmé, že způsob podle vynálezu by bylo možno přizpůsobit pro přenos jakéhokoliv žádaného sledu DNA z vyššího organismu, například obratlovce na jakýkoli mikroorganismus. Vyšší organismus je v tomto případě definován jako eukaryotický organismus s diferencovanými tkáněmi, to znamená, že jde například o hmyz, měkkýše, rostliny, obratlovce, včetně savců, jde tedy například i o skot, vepř, primáty a člověka. Mikroorganismem se rozumí jakýkoli mikroskopický mikroorganismus, a to prokaryotický nebo eukaryotický včetně bakterií, prvoků, řas a hub včetně kvasinek. Při provádění způsobu podle vynálezu se nejpr-

ve izoluje zlepšeným způsobem vybraná buněčná populace. Neporušené mRNA se z těchto buněk extrahuje novým způsobem, jímž se současně potlačí veškerá aktivita ribonukleázy. Neporušená mRNA se čistí z extraktu chromatografií na sloupci a pak se podrobí působení enzymu reverzní transkriptázou, která působí na přítomnosti čtyř desoxynukleosidtrifosfátů, jichž je zapotřebí k syntéze doplňkového řetězce cDNA. Produkt první reakce s použitím reverzní transkriptázy se pak zpracovává tak, že se selektivně odstraní ribonukleotidová sekvence. Zbývající sled desoxynukleotidů, který je komplementární vzhledem k původní mRNA se inkubuje v průběhu druhé reakce za použití reverzní transkriptázy nebo DNA polymerázy za přítomnosti čtyř desoxynukleosidtrifosfátů. Výsledným produktem je dvojitá struktura cDNA, jejíž komplementární řetězce jsou spolu spojeny na jednom konci klíčkovou, tvořenou jediným řetězcem. Tento produkt se pak uvede v reakci se specifickou nukleázou, která uvedenou klíčku odštěpí. Výsledná cDNA s dvojitým řetězcem se pak nastaví na obou koncích tak, že se naváže specifická DNA, která obsahuje místa, na nichž může působit restriční enzym. Tato adice se katalyzuje enzymem DNA ligázou. Výsledný produkt se pak podrobí působení restriční endonukleázy, takže vznikají řetězce s volnými konci, které se mohou navzájem doplňovat.

Působení téhož enzymu se podrobí DNA-plasmid, který obsahuje místa, vhodná pro působení téže restriční endonukleázy, takže dojde k odštěpení polynukleotidového řetězce a vznikají obdobné volné konce, schopné vzájemného navázání na terminálním konci 5'. 5'-fosfátové skupiny se odstraní, aby plasmid nemohl vytvořit prstencovitou strukturu, která by změnila buňku hostitele. Pak se svrchu připravená cDNA a DNA-plasmid spolu inkubují za přítomnosti DNA-ligázy. Za svrchu popsaných reakčních podmínek dojde k tvorbě životaschopných uzavřených kruhů DNA-plasmidu jenom v tom případě, že je přítomna cDNA s příslušnými volnými konci. Takto pozměněný plasmid se pak včlení do vhodné hostitelské buňky, které přijaly takto pozměněný životaschopný plasmid, je nutno zjistit tvorbou kolonií se změněnými vlastnostmi, například s odolností proti určitým chemickým látkám. Čisté bakteriální kmeny, které obsahují rekombinantní plasmid, se pak pěstují a rekombinantní plasmid se znovu izoluje.

Tímto způsobem je možno připravit velká množství rekombinantního plasmidu a tím i znovu izolovat specifický sled cDNA štěpením příslušným restričním enzymem.

Základním způsobem podle vynálezu je možno izolovat a přenést na hostitelský mikroorganismus jakýkoli žádaný sled nukleotidů, získaných z vyššího organismu včetně člověka. Způsob je vhodný pro pře-

nos genetického kódu pro specifickou bílkovinu s lékařským nebo průmyslovým významem a pro mikrobiologickou syntézu takové bílkoviny. Při znázornění způsobu podle vynálezu byla popsána izolace genetického kódu pro insulin krysy, který byl pak přenesen na bakterie a pomnožen. Obdobným způsobem byl izolován i nukleotidový sled pro krysí růstový hormon a tento sled byl rovněž přenesen a pomnožen v bakteriích. Způsob podle vynálezu je možno aplikovat i na přenos sledu nukleotidů, izolovaného z člověka, včetně lidského insulinu, růstového hormonu a dalších hormonů polypeptidové povahy.

Způsob podle vynálezu předpokládá způsob izolace molekuly DNA se specifickým sledem nukleotidů, přenos tohoto materiálu na mikroorganismus a v důsledku toho pomnožení tohoto sledu nukleotidů v uvedeném mikroorganismu.

Sled stupňů, které v sobě způsob podle vynálezu zahrnuje, je možno popsat ve čtyřech základních skupinách.

1. Izolace žádané kopulace buněk z vyššího organismu

Existují dva potenciální zdroje genetického kódu pro specifickou bílkovinu. Jde o DNA organismu a mimoto o modifikovanou RNA tohoto organismu. Podle běžných bezpečnostních předpisů, přijatých National Institutes of Health, je nutno postupovat tak, že lidské geny jakéhokoli druhu je možno zpracovat na rekombinantu DNA a pak přenést na bakterie pouze v tom případě, že geny byly předtím důkladně čištěny na stanoveném zařízení. [Federal Register, sv. 41, č. 131, 7. července 1967, str. 27 902 až 27 943. To znamená, že pro jakýkoli způsob, který by bylo možno použít k výrobě lidských bílkovin, je vhodnější izolovat specifickou mRNA se sledem nukleotidů, který je genetickým kódem pro žádanou bílkovinu. Tento postup má tu další výhodu, že mRNA se snáze čistí než DNA, extrahovaná přímo z buněk. Zvláště pak je možno výhodně využít skutečnost, že u výše diferencovaných organismů, například obratlovců, je možno nalézt specifickou populaci buněk na specifickém místě v organismu, přičemž základní funkcí všech těchto buněk je právě produkce žádané bílkoviny. Může také dojít k tomu, že uvedená populace buněk existuje pouze po přechodnou vývojovou dobu organismu. V těchto buněčných populacích bude mít i velká část mRNA, izolované z buněk, žádaný sled nukleotidů. Je proto možné volit výhodnou buněčnou populaci a výhodný způsob izolace z hlediska počáteční čistoty izolované mRNA.

Ve většině tkání, žláz a dalších orgánů jsou buňky spojovány obvykle fibrózní sítí pojivové tkáně, která zásadně sestává z kolagenu, avšak může obsahovat ještě další látky, například bílkoviny, polysacharidy

nebo anorganické látky v závislosti na druhu tkáně. Izolace buněk z dané tkáně vyžaduje techniku, která uvolní buňky z matrice pojivové tkáně. Izolace a čištění specificky diferencovaného buněčného typu tedy spočívá ve dvou hlavních stupních, a to oddělení buněk z pojivové tkáně a oddělení buněk žádaného typu od dalších buněk dané tkáně. Způsobem podle vynálezu je možno izolovat různé druhy buněk z různých druhů tkání. Příkladem může být izolace Langerhansových ostrůvků ze slinivky břišní, která je nutná pro izolaci mRNA pro insulin.

Buňky, schopné produkovat insulin je možno získat z dalších zdrojů, například z nezralé slinivky břišní telete nebo z tkáňové kultury nádorů těchto buněk. Izolace čistých buněk ostrůvků je v těchto případech daleko jednodušší, zvláště v případě tkáňové kultury. Nebude tedy vždy nutno izolovat buňky přímo ze slinivky břišní, v některých případech je to však výhodné.

Často je možno prokázat, že lze zvýšit podíl žádané mRNA zevními vlivy. Například působením hormonu může dojít ke zvýšené produkci žádané mRNA. Další způsoby jsou například pěstování při určité teplotě, dodání určité živiny nebo jiné chemické látky. Při izolaci mRNA krysího růstového hormonu bylo možno podstatně zvýšit žádaný podíl mRNA pro růstový hormon tak, že se na buňky hypofýzy krysy pěstované ve tkáňové kultuře působilo současně hormonem štítné žlázy a glukokortikoidy.

2. Extrakce mRNA

Důležitým úkolem způsobu podle vynálezu je pokud možno úplné odstranění účinnosti ribonukleázy v buněčném extraktu. Je totiž nutno extrahovat mRNA s jediným polynukleotidovým řetězcem bez dalšího komplementárního řetězce. Z toho vyplývá, že hydrolytické štěpení jediné fosfodiesterové vazby v řetězci by způsobilo nepoužitelnost celé molekuly pro přenos neporušeného genetického sledu na mikroorganismus. Jak již bylo uvedeno, enzym ribonukleáza je velmi rozšířený, účinný a výjimečně stálý. Je možno jej nanést na kůži, beze škody překrácá běžné postupy, užívané při mytí nádobí a často je látkou, která znečišťuje skladované organické chemické sloučeniny. Obtíže jsou zvláště zřejmé v případě, že jde o extrakt buněk ze slinivky břišní, protože tato žláza je zdrojem trávicích enzymů a je proto na ribonukleázu bohatá. Problém tohoto enzymu je však spojen se všemi tkáněmi, a proto je také na všechny tkáně aplikovatelný způsob odstranění účinnosti ribonukleázy podle vynálezu. Výjimečná účinnost tohoto způsobu bude znázorněna na úspěšné izolaci neporušené mRNA buněk Langerhansových ostrůvků.

Při způsobu podle vynálezu se užívá v

průběhu rozrušení buněk a v průběhu všech postupů, žádaných k izolaci RNA, prosté bílkovin, kombinace chaotropického aniontu, chaotropického kationtu a činidla, které rozrušuje disulfidické vazby. Účinnost současného působení všech svrchu uvedených činidel byla prokázána při jejich použití k izolaci neporušené mRNA v dobrém výtěžku z izolovaných buněk krysích Langerhansových ostrůvků.

Volba vhodných chaotropických iontů je založena na jejich rozpustnosti ve vodném prostředí a na jejich dostupnosti. Vhodnými chaotropickými kationty jsou například ionty guanidinové, karbamoylguanidinové, guanylguanidinové, lithné apod. Vhodnými chaotropickými anionty jsou například aniont jodidový, chloristanový, thiokyanátový, diodosalicylátový apod. Relativní účinnost solí, tvořených kombinací uvedených kationtů a aniontů, se stanoví částečně jejich rozpustností. Například diodosalicylát lithný je účinnější než guanidiniumthiokyanát, jeho rozpustnost je však pouze 0,1 N a mimoto je poměrně drahý. Guanidiniumthiokyanát je výhodnou kombinací kationtu a aniontu, protože je snadno dostupný a vysoce rozpustný ve vodných prostředích do koncentrace 5 M.

Je známo, že thiolové sloučeniny, například β -merkapt ethanol, rozrušují intramolekulární disulfidové vazby v bílkovinách podvojnou záměnou. Je známo, že v tomto smyslu je účinná celá řada thiolových sloučenin, například β -merkapt ethanol, dithio-treitol, cystein, propanoldimerkaptan apod. Látky musí být rozpustné ve vodě, protože je nutno je užít ve velkém přebytku vzhledem k počtu intramolekulárních disulfidových vazeb, aby bylo možno dovršit podvojnou záměnu. Nejvýhodnější látkou v tomto smyslu je β -merkapt ethanol, protože je snadno dostupný a poměrně velmi levný.

Při inhibici ribonukleázy v průběhu extrakce RNA z buněk nebo tkání je účinnost dané chaotropické soli přímo závislá na její koncentraci. Nejvýhodnější koncentrace je proto současně nejvyšší použitelná koncentrace. Úspěch způsobu podle vynálezu při uchování neporušené mRNA v průběhu extrakce závisí na rychlosti, s níž se podaří denaturovat ribonukleázu a mimoto na stupni této denaturace. To je patrně příčinou výhodnosti použití guanidiniumthiokyanátu ve srovnání s hydrochloridem, přestože jinak je hydrochlorid jen o málo méně účinný jako denaturační činidlo. Účinnost denaturačního činidla se definuje jako prahová koncentrace, již je nutno dosáhnout k úplné denaturaci bílkoviny. Na druhé straně závisí stupeň denaturace celé řady bílkovin na koncentraci denaturačního činidla, kterou je někdy nutno zvýšit 5× až 10×. Tyto vztahy byly popsány v publikaci Tamford C. A., Adv. Prot. Chem. **23**, 121 (1968). Kvalitativně tedy tento vztah uvádí, že denaturační činidlo, které je jen o málo

účinnější než guanidiniumhydrochlorid, může denaturovat bílkovinu několikrát rychleji při téže koncentraci. Vztahy mezi kinetikou denaturace ribonukleázy a uchováním mRNA v průběhu extrakce z buněk dosud nebyly poznány ani využity. V případě, že jsou svrchu uvedené vztahy správné, znamená to, že výhodným denaturačním prostředkem je prostředek s nízkou prahovou koncentrací a vysokou rozpustností ve vodě. Z tohoto důvodu je výhodnější guanidiniumthiokyanát než diodosalicylát lithný, přestože druhá z těchto látek je daleko účinnějším denaturačním činidlem, a to z toho důvodu, že rozpustnost guanidiniumthiokyanátu je daleko vyšší a proto je možno tuto látku užít v koncentraci, která dovoluje rychlejší inaktivaci ribonukleázy. Svrchu uvedená analýza účinku jednotlivých činidel rovněž poskytuje odpověď nato, proč je výhodnější guanidiniumthiokyanát než poměrně stejně rozpustný hydrochlorid; důvod spočívá v tom, že první z těchto látek je o něco silnějším denaturačním činidlem.

Činidlo, které rozrušuje disulfidové vazby, se užívá ve směsi s denaturačním činidlem proto, že má potencující účinek na denaturaci ribonukleázy. Thiolová sloučenina brání tomu, aby došlo k rychlé denaturaci, k níž může dojít v případě, že intramolekulární disulfidové vazby zůstanou neporušeny. Mimoto se dosahuje toho, že jakákoli další ribonukleáza, zbývající v izolovaném RNA, by zůstala neúčinná i v nepřítomnosti denaturačního činidla. Thiolové sloučeniny, rozrušující disulfidové vazby, jsou účinné v jakékoli koncentraci, i když je výhodnější užít velký přbytek thiolových skupin vzhledem k intramolekulárním disulfidovým vazbám, aby bylo možno zajistit úspěšný průběh reakce ve smyslu intramolekulárního štěpení. Na druhé straně je nutno uvážit, že řada thiolových sloučenin má nepříjemný zápach zejména ve vyšších koncentracích, takže vlastně z praktického hlediska existuje horní možná hranice jejich koncentrace. Při použití β -merkapt ethanolu jsou účinné koncentrace v rozmezí 0,05 až 1,0 M, optimální koncentrace je pro izolaci neporušené RNA z krysí slinivky břišní 0,2 M.

Prostředí, v němž se provádí extrakce mRNA z buněk, má mít pH v rozmezí 5,0 až 8,0.

Po rozrušení buněk se RNA oddělí od DNA a ostatních buněčných bílkovin. K tomuto účelu byla vyvinuta řada způsobů, které jsou všechny použitelné a v literatuře popsány. Běžným způsobem je srážení ethanolem, při němž se selektivně vysráží RNA. Výhodným způsobem pro použití při provádění způsobu podle vynálezu je vynechat srážecí stupeň a navrstvit homogenát přímo na roztok 5,7 M chloridu cezného ve zkumavce odstředivky s následným odstře-

děním způsobem, popsaným v publikaci Glisin, V., Crkvenjakov R., a Byus C., *Biochemistry* **13**, 2633 (1974). Tento způsob je nejvýhodnější, protože se trvale udržuje prostředí, nepříznivé pro ribonukleázu a je tedy možno získat RNA o vysokém výtěžku, prostou DNA a bílkovin.

Svrchu uvedeným způsobem je možno získat čistou RNA z buněčného homogenátu. Pouze část této RNA je žádaná mRNA. Aby bylo možno dále čistit žádaný podíl, využije se s výhodou skutečnosti, že v buňkách vyšších organismů je mRNA po svém vzniku dále pomnožována buňkou navázáním polyamidové kyseliny. Tento podíl mRNA, který obsahuje sled kyseliny polyadenylové, je možno selektivně izolovat chromatografií na sloupci celulózy, na níž je navázán oligochymidylát způsobem, popsaným v publikaci Aviv H. a Leder P., tak jak byla svrchu uvedena. Svrchu uvedené postupy dostačují pro získání čisté, neporušené mRNA ze zdrojů, bohatých na ribonukleázu. Další čištění tohoto podílu a další postupy in vitro je možno provádět v podstatě stejně pro jakýkoli typ mRNA bez ohledu na zdroj.

Za určitých okolností, například v případě, že zdrojem mRNA je tkáňová kultura, může být znečištění ribonukleázou tak nízké, že není nutné užít svrchu uvedený způsob inhibice ribonukleázy. V těchto případech stačí běžné metody, užívané pro snížení aktivity ribonukleázy.

3. Tvorba cDNA

Na obr. 1 je schematicky znázorněn postup, který se týká zbývajících stupňů způsobu podle vynálezu. Prvním stupněm je tvorba sledu komplementární DNA k čištěné mRNA. Enzymem, který se pro tuto reakci užívá, je obvykle reverzní transkriptáza, přestože v zásadě je možno užít jakéhokoli enzymu, kterým je možno vytvořit komplementární řetězec DNA při použití mRNA jako podkladu. Reakci je možno provádět za podmínek, popsaných ve známé literatuře, přičemž jako základu se užije mRNA a směsí čtyř desoxynukleosidtrifosfátů jako prekurzoru řetězce DNA. Je výhodné, užije-li se jeden z desoxynukleosidtrifosfátů ve formě, značené ^{32}P v poloze α , aby bylo možno sledovat průběh reakce a včas izolovat produkt po oddělení balastních látek například chromatografií nebo elektroforézou. Značení radioaktivním fosforem je výhodné také pro kvantitativní stanovení výtěžku, jak bylo popsáno i ve svrchu uvedené publikaci Efstratiadis A., a další.

Jak je dále uvedeno v obr. 1, je produktem reakce s použitím reverzní transkriptázy struktura s dvojitým řetězcem tvaru vlásenky, s nekovalentní vazbou mezi řetězcem RNA a řetězcem DNA.

Produkt reakce s použitím reverzní transkriptázy struktura s dvojitým řetězcem tvaru

ru vlásenky, s nekovalentní vazbou mezi řetězcem RNA a řetězcem DNA.

Produkt reakce s použitím reverzní transkriptázy se odstraní z reakční směsi běžným způsobem. Bylo zjištěno, že je výhodné užít kombinaci extrakce fenolem, chromatografie na Sephadexu G-100 (Pharmacia Inc., Uppsala, Švédsko) a srážení ethanolem.

Jakmile dojde k enzymatické syntéze cDNA, je možno odstranit základní RNA. V literatuře je známa celá řada způsobů pro selektivní degradaci RNA za přítomnosti DNA. Výhodným způsobem je alkalická hydrolýza, která je vysoce selektivní a je možno ji snadno řídit úpravou pH.

Po alkalické hydrolýze s následnou neutralizací je popřípadě možno koncentrovat cDNA, značenou ^{32}P vysrážením ethanolem.

Syntéza cDNA s dvojitým řetězcem tvaru vlásenky se dovrší použitím příslušného enzymu, například DNA polymerázy nebo reverzní transkriptázy. Užije se reakčních podmínek, které jsou obdobné svrchu popsaným podmínkám včetně použití nukleosidtrifosfátu, značeného v poloze α radioaktivním fosforem. Reverzní transkriptázu je možno získat z celé řady zdrojů. Vhodným a běžným zdrojem je virus ptačí myeloblastózy. Tento virus je možno získat od Dr. D. J. Beard, Life Sciences Incorporated, St. Petersburg, Florida, kde se produkuje tento virus ve spolupráci s National Institutes of Health.

Po tvorbě cDNA se strukturou vlásenky může být žádoucí získat z reakční směsi čistou DNA. Jak již bylo svrchu uvedeno, je výhodné užít extrakci fenolem, chromatografií na sloupci Sephadexu G-100 a srážení ethanolem, čímž je možno získat čistou DNA prostou znečišťujících bílkovin.

Strukturu tvaru vlásenky je možno převést na běžnou strukturu DNA s dvojitým řetězcem odstraněním jednoduché smyčky, která spojuje oba konce komplementárních řetězců. K tomuto účelu je možno užít celou řadu enzymů, které jsou schopné hydrolyticky odštěpit jednoduché řetězce DNA. Vhodným enzymem tohoto použití je S1 nukleáza, izolovaná z *Aspergillus oryzae*. Tento enzym je možno získat od Miles Research Products, Elkhart, Indiana. Působením S1 nukleázy na DNA strukturu tvaru vlásenky se ve vysokém výtěžku získá molekula cDNA s odpovídajícím zakončením. Po extrakci, chromatografii a svrchu popsaném srážení ethanolem se získá čistý produkt. Použití reverzní transkriptázy a S1 nukleázy při syntéze cDNA s dvojitým řetězcem jako struktury, odpovídající mRNA bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Efstratiadis a dalších.

Je-li to žádoucí, může být zvýšen podíl molekuly cDNA s odpovídajícími konci použitím DNA-polymerázy I z *E. coli* za přítomnosti čtyř desoxynukleosidtrifosfátů.

Kombinace exonukleázového a polymerázového účinku tohoto enzymu má za následek, že se odstraní volná zakončení 3' a vznikne vazba na všech zakončeních 5'. Tím se zajistí maximální účast molekuly cDNA v následných vazebných reakcích.

Další stupeň způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se na zakončení takto získané cDNA působí tak, aby bylo možno získat sledy, které obsahují místa vhodného účinku restriční endonukleázy. Volba fragmentu DNA, který se váže na uvedená zakončení, závisí na reakčních možnostech. Sled, který se má na tyto zakončení navázat, se volí podle zvolené restriční endonukleázy a volba tohoto enzymu dále závisí na volbě DNA-vektoru, který je určen pro rekombinaci cDNA. Zvolený plasmid by měl obsahovat alespoň jedno místo, v němž může působit restriční endonukleáza. Například plasmid pMB9 obsahuje jedno místo, v němž může působit restriční enzym Hind III. Hind III se izoluje z *Hemophilus influenzae* a čistí se způsobem, popsaným v publikaci Smith H. O. a Wilcox K. W., J. Mol. Biol. **51**, 379 (1970). Obdobný enzym Hae III z *Hemophilus aegypticus* se čistí způsobem, popsaným v publikaci Middleton J. H., Edgell M. H. a Hutchison III, C. A., J. Virol. **10**, 42 (1972). Enzym z *Hemophilus suis*, označený Hsu I, katalyzuje specificky hydrolýzou na tomtéž místě jako Hind III. Tyto dva enzymy je tedy, pokud je o funkci, možno zaměnit.

Je výhodné užít chemicky syntetizovaný dekanukleotid s dvojitým řetězcem, který obsahuje místo, v němž může působit Hind III, a tento řetězec navázat na konce cDNA. Dekanukleotid s dvojitým řetězcem má sled, který je znázorněn na obr. 1 a byl popsán v publikaci Heyneker H. L. a další a Scheller R. H. a další. K dispozici je celá řada podobných sledů, které obsahují místo, v němž může restriční enzym působit, takže je možno obsadit zakončení dvojitého řetězce DNA tak, aby výsledná látka byla citlivá na jakoukoli zvolenou restriční endonukleázu.

Navázání svrchu uvedených sledů s místy, citlivými na restriční endonukleázu na konce cDNA může být provedeno jakýmkoli známým způsobem. Velmi výhodným způsobem je metoda, katalyzovaná DNA-ligázou, čištěnou způsobem, popsaným v publikaci Panet A. a další, Biochemistry **12**, 5045 (1973). Vazebná reakce byla popsána ve svrchu uvedené publikaci Sgaramellové. Produkt této reakce mezi cDNA a velkým molekulárním přebytkem dekanukleotidu s dvojitým řetězcem s obsahem míst, vhodných pro působení restriční endonukleázy Hind III je cDNA s uvedenými řetězci na každém konci. V případě, že se na tento reakční produkt působí enzymem Hind III, dojde ke štěpení na svrchu uvedených místech za tvorby jednoduchého řetězce se zakončení-

mi 5', která se mohou navzájem doplňovat, jak je zřejmé z obr. 1.

4. Tvorba vektoru pro přenos rekombinanty DNA

V zásadě je možno užít velké množství DNA z virů a plasmidů k tvorbě rekombinant s cDNA, připravené popsaným způsobem. Zásadní požadavky spočívají v tom, aby zvolený vektor pro přenos DNA bylo možno včlenit do buňky hostitele, aby jej bylo možno v této buňce pomnožit, a aby tento vektor obsahoval genetickou determinantu, s jejíž pomocí by bylo možno oddělit ty buňky hostitele, které vektor obsahují. Z bezpečnostního hlediska je nutno omezit volbu těchto vektorů tak, aby vektory odpovídaly požadavkům National Institutes of Health (NIH). Seznam povolených vektorů pro přenos DNA se stále rozšiřuje s objevem nových vektorů a podléhá schválení instituce NIH Recombinant DNA Safety Committee, přičemž vynález předpokládá možné použití jakýchkoli DNA virového nebo plasmidového původu s potřebnými schopnostmi včetně těch, které budou NIH teprve později povoleny. Vhodné vektory, které již povoleny jsou, zahrnují v sobě celou řadu derivátů bakteriofágu lambda (Blattner, F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L. A., Grunwald D. J., Kiefer D. O., Moore D. D., Schumm J. W., Sheldon E. L. a Smithies O., Science **196**, 161 [1977] a deriváty plasmidu col E1, popsané například v publikaci Rodriguez R. L., Bolivar S., Goodman H. M., Boyer H. W. a Betlach M. N. ICN-UCLA Symposium on Molecular Mechanisms In The Control of Gene Expression, D. P. Nierlich, W. J. Rutter, C. F. Fox, Eds. (Academic Press, NY, 1976), str. 471 až 477. Plasmidy, odvozené od col E1 jsou poměrně malé, jejich molekulární hmotnost je řádu několika miliónů a mají tu vlastnost, že počet kopií DNA plasmidu v jediné hostitelské buňce je možno zvýšit z běžných 20 až 40 na 1000 i více tak, že se na hostitelskou buňku působí chloramfenikolem. Schopnost zvýšit množství genu v hostitelské buňce umožňuje za určitých podmínek přinutit hostitelskou buňku k výrobě primárních bílkovin, jejichž kódy jsou nesený geny, obsaženými v plasmidu. Tyto deriváty col E1 jsou proto výhodnými vektory pro použití při provádění způsobu podle vynálezu. Vhodné deriváty col E1 jsou například plasmidy pMB9, nesoucí gen pro odolnost proti tetracyklinu a plasmidy pBR-313, pBR-315, pBR-316, pBR-317 a pBR-322, které obsahují kromě genu pro rezistenci proti tetracyklinu ještě gen pro rezistenci proti ampiclinu. Přítomnost genů pro odolnost proti těmto látkám je výhodnou vlastností pro rozeznání buněk, které byly úspěšně infikovány plasmidem, protože kolonie tako-

vých buněk porostou i za přítomnosti uvedené látky, kdežto buňky, které plasmid neobsahují, zahynou. Ve svrchu popsaných pokusech i v dále uvedených příkladech byl užít plasmid, odvozený od col E1, který obsahoval kromě genu pro odolnost proti určité látce také místo pro působení enzymu Hind III.

Stejně jako je tomu při volbě plasmidu, je možno volit hostitelskou buňku z poměrně široké škály možností, toto množství však bylo nutno zúžit z bezpečnostních důvodů.

Plasmid pBR-322 byl podobně popsán v publikaci Bolivar F. a další, Gene, 2, 95 [1977], kde se popisuje syntéza i vlastnosti tohoto plasmidu. Plasmid pBR-322 má molekulární hmotnost $2,7 \times 10^6$ daltonů. (kontrolováno, Bolivar F., Gene, 4, 121 [1978]) a nese gen pro odolnost proti ampicilinu (Ap^R) a gen pro odolnosti proti tetracyklinu (Tc^R). Nese jediné místo pro působení restrikční endonukleázy Pst I v genu Ap^R . Nese jediné místo pro působení endonukleázy Hind III, Sal I a Bam HI v oblasti genu Tc^R . Kromě toho nese plasmid pBR-322 jediné místo pro působení enzymu Eco RI, dvě místa pro působení Hinc II, pět míst pro působení Eco RII, tři místa pro působení Bgl I, dvanáct míst pro působení Alu I, dvanáct míst pro působení Hae II a sedmáct míst pro působení Hae III. Podrobný popis těchto míst v plasmidu pBR-322 je uveden na straně 103 první citace. V případě, že dojde k štěpení plasmidu pBR-322, dojde ke ztrátě genu Ap^R , do místa pro působení restrikční endonukleázy Pst I je pak možno včlenit DNA. Obdobně v případě, že plasmid pBR-322 je štěpen restrikční endonukleázou Hind III nebo Sal I nebo Bam HI s včleněním DNA, dojde ke ztrátě genu Tc^R . V případě, že se do místa pro působení Pst I včlení DNA, je možno najít rekombinantní molekuly při selekci na kolonie, které jsou senzitivní na ampicilin (Ap^S) a mají Tc^R . Obdobně v případě, že se včlení DNA do místa pro působení Hind III, Sal I nebo Bam HI, je možno nalézt rekombinantní molekuly při selekci kolonií, které jsou Ap^R a Tc^S . Vektor, který obsahuje cizorodou DNA, včleněnou na kterékoliv z uvedených čtyř míst, je možno charakterizovat vzhledem k odolnosti proti antibiotikům jako $Ap^S Tc^R$ nebo $Ap^R Tc^S$. Vektor je možno dále charakterizovat odstraněním včleněné DNA a stanovením molekulové hmotnosti obou produktů při srovnání s molekulovou hmotností výchozích materiálů. Další charakterizaci je možno provést sestrojením úplné mapy míst pro působení restrikčních endonukleáz v tomto vektoru. Je také možno stanovit sled včleněné DNA.

Rovněž plasmid pBR-323 byl podrobně popsán. Syntéza a vlastnosti tohoto plasmidu byly popsány v publikaci Bolivar F. a další, Gene 2, 75 [1977]. Plasmid pBR-313 má molekulární hmotnost $5,8 \times 10^6$ daltonů a obsa-

huje gen pro odolnost proti ampicilinu (Ap^R) a gen pro odolnost proti tetracyklinu (Tc^R). Tento plasmid obsahuje jediné místo pro působení restrikční endonukleázy Hind III, Sal I a Bam HI v oblasti genu Tc^R . Byla provedena úplná analýza plasmidu pBR-313 a byla sestrojena mapa míst pro působení restrikčních endonukleáz, tato mapa je uvedena na straně 84 svrchu uvedené publikace. Při včlenění cizorodé DNA do kteréhokoliv místa pro působení Hind III, Sal I nebo Bam HI dochází ke ztrátě Tc^R . Je tedy možno nalézt rekombinantní molekuly při selekci kmenů s Ap^R a Tc^S . Vektor je možno charakterizovat odolností proti antibiotikům, sledem DNA a molekulární hmotností.

Třetím plasmidem, který byl podrobně popsán, je pMB 9. Tento plasmid je možno připravit podle publikace Rodriguez R. L. a další, tak jak bylo svrchu uvedeno, a Bolivar F. a další, Gene, 2 75 [1977]. Plasmid pMB 9 má molekulární hmotnost $3,5 \times 10^6$ daltonů a obsahuje gen pro odolnost proti tetracyklinu Tc^R . Má jediné místo pro působení každé z endonukleáz Eco RI, Hind III, Sal I nebo Bam HI. Místo pro působení posledních tří endonukleáz se nachází v genu Tc^R . V případě, že se včlení cizorodá DNA do místa pro působení Hind III, Sal I nebo Bam HI, dochází ke ztrátě Tc^R . Vektor s obsahem cizorodé DNA v jednom z těchto míst je možno charakterizovat touto vlastností. Tento vektor je dále možno charakterizovat analýzou sledu DNA včleněné části, srovnáním molekulární hmotnosti analýzou míst pro působení endonukleáz.

Plasmid pS-101 byl rovněž podrobně popsán. V publikaci Cohen S. H. a další, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1293 [1973] se popisuje syntéza a vlastnosti tohoto plasmidu. Další vlastnosti plasmidu je možno nalézt v publikacích Cohen S. N. a další, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3240 [1973], Boyer H. W. a další, Recombinant Molecules, Beers R. F. a Basset, E. G., Eds, Raven Press, New York na str. 13 [1977] a Cohen S. N. a další, Recombinant Molecules, na str. 91. Plasmid pS-101 má molekulární hmotnost $5,8 \times 10^6$ daltonů a obsahuje gen pro odolnost proti tetracyklinu Tc^R . V oblasti tohoto genu obsahuje jediné místo pro působení každé z endonukleáz Hind III, Sal I a Bam HI. Kromě toho obsahuje jediné místo pro působení Eco RI, jedno místo pro působení Hpa I, jedno místo pro působení Sma I a čtyři místa pro působení Hinc II. V případě, že tento plasmid se štěpí enzymem Hind III, dochází ke ztrátě Tc^R . Totéž platí pro štěpení v místě Sal I nebo Bam HI, při včlenění DNA do některého z těchto míst je možno nalézt při selekci rekombinantní molekuly. Vektor s obsahem cizorodé DNA v některém z těchto míst je možno charakterizovat ztrátou odolnosti proti antibiotikům. Vektor je možno dále charakterizovat [a] odstraněním včleněné DNA a stanovením a

srovnáním molekulární hmotnosti, (b) sestrojením mapy míst pro působení endonukleáz a (c) stanovením sledu včleněné DNA.

Fágy pro vektory obsahují například deriváty fágu lambda, který se nazývá Charon, zejména Charon 3A, Charon 4A a Charon 16A. Tyto fágy byly podrobně popsány. Blatner a další ve svrchu uvedené publikaci popisují syntézu a vlastnosti těchto fágů. Tyto fágy byly také zmapovány včetně míst pro působení endonukleáz, jak je uvedeno na straně 161 svrchu uvedené publikace. Genotyp každého fágu je uveden na straně 164 současně s výsledkem štěpení v různých místech. Například při včlenění cizorodé DNA do místa pro působení Eco RI ve fágu Charon 16A způsobí ztrátu genu *lac*⁵. Růst rekombinačního fágu na bakteriích *lac*⁻ má za následek tvorbu bezbarvých kolonií. To znamená, že vektor s obsahem cizorodé DNA v příslušném místě je možno charakterizovat genetickými vlastnostmi, například bezbarvými skvrnami na bakteriích *lac*⁻. Vektor je možno dále charakterizovat odstraněním včleněné DNA a stanovením molekulové hmotnosti obou produktů za současného srovnání s molekulovou hmotností výchozích produktů. Další charakterizaci je možno provést sestrojením mapy míst pro působení endonukleáz ve vektoru. Je také možno zjistit sled včleněné DNA.

Stejně dobře byl popsán *λgtWES*. *λB*, derivát bakteriofágu lambda. Syntéza a základní vlastnosti tohoto fágu byly popsány v publikaci Tremeier D. a další, *Nature* **263**, 526 (1976). Další vlastnosti tohoto fágu byly popsány v publikaci Leder P. a další, *Science*, **196**, 175 (1977). Genotyp tohoto fágu byl identifikován v obou publikacích. Druhá z publikací také identifikuje uložení obou míst pro působení restrikčních endonukleáz Eco RI a Sst I. Tento fág obsahuje čtyři místa pro působení Bam HI, čímž je možno získat fragmenty v délce $5,4 \times 10^3$, $19,3 \times 10^3$, $3,8 \times 10^3$ a $11,4 \times 10^3$ párů bází. Analýza míst pro působení restrikčních endonukleáz je uvedena na straně 527 svrchu uvedené publikace. Fragment lambda B je odstraněn působením enzymu Eco RI a štěpen enzymem Sst I. Tím je možno zabránit rekombinaci s fragmentem lambda B. Je také možno včlenit cizorodou DNA s místy pro štěpení enzymem Eco RI do fágu v místě štěpení enzymem Eco RI. Fágy je možno klonovat hybridizací in situ, jak bylo popsáno v publikaci Benton W. D. a Davis R. W., *Science*, **196**, 180 (1977). Vektor je možno charakterizovat (a) odstraněním včleněné DNA a stanovením a srovnáním molekulových hmotností, (b) analýzou míst pro působení restrikčních endonukleáz a (c) stanovením sledu včleněné DNA.

Byl vyvinut kmen *E. coli*, označený X-

-1776 a bylo dosaženo schválení NIH pro použití tohoto kmene a při současném použití zařízení P2, jak bylo popsáno v publikaci Curtiss, III, R., *Ann. Rev. Microbiol.*, **30**, 507 (1976). *E. coli* RR-1 je vhodný v případě, že je možno užít zařízení typu P3. Stejně jako v případě plasmidů je zřejmé, že se předpokládá použití jakéhokoli kmene hostitelských buněk při provádění způsobu podle vynálezu, pokud je tento kmen schopen přenášet zvolený vektor, a to včetně hostitelů odlišných od bakterií, jako jsou například kvasinky, v případě, že tyto kmeny budou v budoucnosti povoleny NIH.

Rekombinantní plasmidy se tvoří smísením plasmidu DNA, na nějž bylo působeno restrikční endonukleázou a cDNA s odpovídajícím způsobem zpracovanými koncovými skupinami. Aby bylo možno na co nejmenší míru omezit vazbu cDNA navzájem, přidává se plasmid ve velkém molárním přebytku. V dříve popsaných způsobech mělo přidání plasmidu ve velkém přebytku obvykle za následek vazbu plasmidových řetězců do kruhu, aniž by současně došlo ke včlenění fragmentu cDNA. Takto zpracované buňky obsahovaly obvykle převážně plasmid bez rekombinanty cDNA. V důsledku toho byl celý postup velice náročný na čas. Byly proto číněny pokusy získat DNA vektory s místem pro působení restrikční endonukleázy uprostřed zvoleného genu, takže včlenění rekombinanty rozdělí gen a tím způsobí ztrátu funkce, jejímž kódem je uvedený gen.

S výhodou se užívá způsobu, jímž je možno snížit počet kolonií, které je nutno sledovat v případě, že se užije rekombinantní plasmid. Tento způsob spočívá v tom, že se na plasmid, na nějž se nejprve působí restrikční endonukleázou, zpracuje ještě alkalickou fosfatázou, která je dostupná z několika zdrojů, například Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey. Alkalická fosfatáza odstraní 5'-terminální fosfátové skupiny ze zakončení plasmidu po působení endonukleázy a tím zabrání vzájemnému navázání koncových částí plasmidu DNA. V důsledku toho tvorba kruhu závisí na včlenění fragmentu DNA s obsahem 5'-terminálních fosfátových skupin. Svrchu uvedeným způsobem je možno snížit relativní frekvenci transformace bez rekombinace na méně než 1 až 10^{-4} .

Vynález je založen na skutečnosti, že reakce, katalyzovaná DNA-ligázou je provedena mezi 5'-fosfátovou koncovou skupinou DNA a 3'-hydroxylovými koncovými skupinami DNA. V případě, že se terminální 5'-fosfátové skupiny odstraní, k reakci nedojde. V případě, že se váže DNA s dvojitým řetězcem, může dojít ke třem typům situací, jak je znázorněno v tabulce I.

TABULKA I

Případ	Reakční složky	Produkt po použití ligázy
I	$ \begin{array}{c} 3' \\ \text{----- OH} \\ \\ \text{----- OPO}_3\text{H}_2 \\ 5' \end{array} + \begin{array}{c} 5' \quad 3' \quad 5' \\ \text{H}_2\text{O}_3\text{PO} \text{-----} \text{Q-P-O} \text{-----} \\ \\ \text{HO} \text{-----} \text{O-P-O} \text{-----} \\ 3' \quad 5' \quad 3' \end{array} $	$ \begin{array}{c} 3' \quad 5' \\ \text{----- OH} \text{-----} \text{O-P-O} \text{-----} \\ \\ \text{----- OPO}_3\text{H}_2 \text{-----} \text{O-P-O} \text{-----} \\ 5' \quad 3' \end{array} + 2 \text{ H}_2\text{O} $
II	$ \begin{array}{c} 3' \\ \text{----- OH} \\ \\ \text{----- OH} \\ 5' \end{array} + \begin{array}{c} 5' \quad 3' \quad 5' \\ \text{H}_2\text{O}_3\text{P-O} \text{-----} \text{O-P-O} \text{-----} \\ \\ \text{HO} \text{-----} \text{OH} \text{ HO} \text{-----} \\ 3' \quad 5' \quad 3' \end{array} $	$ \begin{array}{c} 3' \quad 5' \\ \text{----- OH} \text{-----} \text{O-P-O} \text{-----} \\ \\ \text{----- OH} \text{-----} \text{O-P-O} \text{-----} \\ 5' \quad 3' \end{array} + \text{H}_2\text{O} $
III	$ \begin{array}{c} 3' \\ \text{----- OH} \\ \\ \text{-----} \\ 5' \end{array} + \begin{array}{c} 5' \\ \text{HO} \text{-----} \\ \\ \text{HO} \text{-----} \\ 3' \end{array} $	O reakce

V tabulce I je DNA s dvojitým řetězcem schematicky znázorněna plnými paralelními čarami, odpovídající 5'- a 3'-koncové skupiny jsou označeny hydroxylovým nebo fosfátovým zbytkem podle své povahy. V případě I se nachází 5'-fosfát na obou zakončeních, v důsledku toho dochází ke kovalentní vazbě obou těchto řetězců. V případě II má pouze jeden řetězec terminální 5'-fosfátovou skupinu, takže po kovalentní vazbě zůstává diskontinuita na dalším řetězci. Řetězec, který není kovalentně vázán, zůstává spojen s navázanou molekulou vodíkovými vazbami, k nimž dochází mezi oběma řetězci, jak je z literatury známo. V případě III nedochází k vazbě na žádném ze zakončení, protože z nich neobsahuje 5'-fosfátovou skupinu.

Nežádoucím vazebným reakcím je možno bránit tak, že se ze zakončení, na nichž nemá dojít k vazbě, odstraní 5'-fosfátové skupiny. K tomuto účelu je možno užít jakéhokoli způsobu pro odstranění 5'-fosfátových skupin, pokud nedojde k porušení struktury DNA. Výhodným postupem je hydrolýza, katalyzovaná enzymem alkalické fosfatázy.

K znázornění svrchu uvedených postupů byla izolována cDNA pro kryší insulin a podrobena rekombinaci s plasmidem. DNA-molekuly byly užity k přeměně *E. coli* X-1776. Transformované buňky byly podrobeny selekci růstem na živném prostředí, které obsahovalo tetracyklin. Jedna rekombinantní plasmidu DNA, získaná z takto transformovaných buněk obsahovala DNA-fragment, obsahující přibližně 410 nukleotidů. Mimoto byly získány a izolovány podobným způsobem další rekombinanty, které byly rovněž analyzovány. Fragmenty byly uvolněny z plasmidu použitím enzymu Hind III nebo Hsu I a pak byly podrobeny analýze na sled DNA způsobem, popsáným v publikaci Maxam A. M. a Gilbert W., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA **74**, 560 (1977). Sekvence nukleotidů v DNA fragmentu se překrývá a obsahovala úplný kódovací sled pro kryší proinsulin I a rovněž 13 z 23 aminokyselin prepeptidového sledu. Byla zjištěna úplná nukleotidová sekvence pro svrchu uvedený produkt.

Obdobným způsobem byl izolován i cDNA-kód pro kryší růstový hormon, tento produkt byl rekombinován s plasmidem a přenesen do buněk *E. coli*. Tímto způsobem bylo možno znovu izolovat sled nukleotidů o počtu přibližně 800 nukleotidů po úspěšném pomnožení v buňkách *E. coli*, přičemž tento sled obsahoval celý kód pro kryší růstový hormon včetně částí peptidového prekursoru a část 5'-oblasti, která nebyla přenesena.

Svrchu popsaný způsob je obecně možno použít pro izolaci a čištění jakéhokoli genu z vyššího organismu, včetně lidských genů a pro přenos a pomnožení těchto genů v buňkách mikroorganismů. Nové rekombinantní plasmidy obsahují celý izolovaný gen nebo pouze jeho část, jak bylo svrchu popsáno. Byly rovněž popsány nové mikroorganismy, dosud neznámé, jejichž genetický systém je pozměněn tak, že obsahuje i geny z vyššího organismu. Dále budou popsány specifické příklady, v nichž bude podrobně popsán každý stupeň způsobu podle vynálezu, pokud jde o izolaci, čištění a přenos genu kryšího insulinu do buněk *E. coli*, čímž bude blíže objasněna použitelnost způsobu podle vynálezu. V následujících příkladech jsou také blíže charakterizovány rekombinantní plasmidy, které obsahují část genu pro kryší insulin, genu pro kryší růstový hormon, gen pro lidský insulin a gen pro lidský růstový hormon.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Popsané postupy osvětlují extrakci a izolaci mRNA pro kryší insulin, syntézu komplementární DNA a popis vlastností komplementární DNA. Čištěné buňky kryších Langerhansových ostrůvků je možno získat tak, že se slinivka břišní anestetizované krysy podrobí infúzi Hanksovým roztokem retrográdní infúzí vývodem této žlázy. Hanksův roztok je standardní směs solí, je znám a je možno jej získat od řady výrobců, například od Grand Island Biological Supply Company, Grand Island, New York. Slinivka se pak odstraní, rozdrtí v Hanksově roztoku při 0 °C a natráví kolagenázou a sójovým trypsinem. Všechny postupy se provádí při teplotě 0 až 4 °C, není-li uvedeno jinak. Zvláště je nutno zachovávat tyto podmínky při natrávení žlázy. Dvě kryší slinivky břišní v 8 ml Hanksova prostředí se uloží do skleněné zkumavky o objemu 30 ml. Všechny skleněné zkumavky byly předem zpracovány pomocí silikonu. K tomuto účelu bylo užito přípravku Siliclad, (Clay-Adams Division, Becton-Dickinson Inc., Parsippany, New Jersey. Inkubační směs obsahovala 12 mg kolagenázy, tj. enzymu, připraveného z *Clostridium histolyticum* způsobem, popsáným v publikaci Mandl I., Mackennan J. D. a Howes E. L., J. Clin. Invest. **32**, 1323 (1943), bylo užito typu CLS IV (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey) a 1 mg inhibitoru trypsinu ze sójových bobů, (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri). Inkubaci je nutno provádět při teplotě 37 °C po dobu 25 minut za stálého třepání při 90 výkyvech za minutu. Směs je nutno stále pozorovat, aby bylo možno zajistit, že natrávení kolagenázou se provádí do optimálního rozsahu. V případě, že inkubace je příliš krátká, nedojde k úplnému uvolnění buněk Langerhansových ostrůvků, naproti tomu v případě, že je inkubace příliš dlouhá, dochází k rozrušení těchto buněk. Po inkubaci se zkumavka odstřeďuje 1 minutu při 200 g. Supernatant se slije a segment se promyje Hanksovým roztokem a postup se 5krát opakuje. Po posledním odstředění se sediment uvede v suspenzi v 15 ml přípravku Ficoll (Pharmacia Chemical Company, Uppsala, Švédsko) o hustotě 1,085. Pak se přidá vrstva přípravku Ficoll o hustotě 1,080 a vrstva 5 ml přípravku Ficoll o hustotě 1,060, načež se zkumavka odstřeďuje 5 minut při 500 g a pak ještě 5 minut při 2000 g. V důsledku tohoto postupu zůstanou buňky acínů na dně zkumavky a buňky ostrůvků vytvoří vrstvu mezi dvěma horními vrstvami přípravku. Pás buněk ostrůvků obsahuje ještě gangliové buňky, lymfatické buňky a buňky pojivové tkáně. Velké fragmenty však byly odstraněny. Takto získané buňky se umístí pod mikroskop, pod nímž je možno odstranit viditelné znečištění ručně při použití mikropipety. Pak se buň-

ky zředí Hanksovým roztokem a znovu se odstředí, Supernatant se slije a sediment se skládá v kaplném dusíku.

Buňky ostrůvků z 200 kryší se společně homogenizují v 4 M guanidiniumthiokyanátu (přípravek Tridom, Fluka AG Chemische Fabrik, Buchs, Švýcarsko) s obsahem 1 M β -merkaptioethanolu a pufru, který udržuje pH roztoku na hodnotě 5,0 při teplotě 4 °C. Homogenát se navrství na 1,2 ml roztoku chloridu cesného o koncentraci 5,7 M s obsahem 100 mM EDTA a roztok se odstřeďuje 18 hodin při 37 000 otáčkách za minutu v SW 50,1 rotoru ultraodstředivky při teplotě 15 °C. (Beckman Ultracentrifuge Instrument Company, Fullerton, California). Při odstředění se RNA dostává na dno zkumavky.

RNA s polyadenylátovými skupinami se izoluje chromatografií veškeré RNA na oligo-(dT)-celulóze způsobem, popsáným ve svrchu uvedené publikaci Aviv H. a Leder P.

Reverzní transkriptáza z viru ptačí myeloblastózy (D. J. Beard, Life Science Inc., St. Petersburg, Florida) se pak užije k přenosu struktury celé polyadenylátové RNA z kryších ostrůvků do cDNA. Reakce se provádí v 50 mM tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,3 s obsahem 9 mM $MgCl_2$ 30 mM NaCl, 20 mM β -merkaptioethanolu, 1 mM každého z 3 neradioaktivních desoxyribonukleosidtrifosfátů, 250 μ M čtvrtého desoxynukleosidtrifosfátu, značeného v poloze α a radioaktivním fosforem se specifickou aktivitou 50 až 200 curie v 1 molu, 20 μ g/ml oligo-dT₁₂₋₁₈ (Collaborative Research, Waltham, Massachusetts), 100 μ g/ml polyadenylované RNA a 200 jednotek/ml reverzní transkriptázy. Směs se inkubuje 15 minut při teplotě 45 °C. Pak se přidá sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové do koncentrace 25 mM a roztok se extrahuje stejným objemem fenolu, nasyceného vodou, načež se vodná fáze chromatografie na sloupci o rozměrech 0,3 $\times$ 10 cm s obsahem Sephadex G-100 v 10 mM tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 9,0 s obsahem 100 mM NaCl a 2 mM EDTA. Nukleová kyselina se vysráží ethanolem po přidání octanu amonného při pH 6,0 do koncentrace 0,25 M. Sraženina se oddělí odstředěním, sediment se rozpustí v 50 μ l čerstvě připraveného 0,1 M roztoku hydroxidu sodného a inkubuje při teplotě 70 °C po dobu 20 minut k hydrolyze RNA. Pak se směs neutralizuje přidáním 1 M octanu sodného při pH 4,5 a ³²P-cDNA se vysráží ethanolem a znovu rozpustí ve vodě. Podíly cDNA s jednoduchým řetězcem se analyzují na polyakrylamidovém gelu způsobem popsáným v publikaci Dingman C. W. a Peacock A. C., Biochemistry **7**, 659 (1968). Gel se suší a ³²P-cDNA se zjistí autoradiografií na filmu Kodak No-Screen NS-2T (Eastman Kodak Corporation, Rochester, New York). Materiál byl heterodisperzní, jak bylo možno

usoudit z elektroforézy. Obsahoval alespoň jeden hlavní druh cDNA se 450 nukleotidy, jak bylo možno prokázat srovnáním se známým standardem.

Příklad 2

V tomto příkladu bude popsána syntéza s vlastnostmi cDNA s dvojitým řetězcem a s obsahem sledu kryšího insulinu, tak jak byl svrchu popsán. Na cDNA s jednoduchým řetězcem z příkladu 1 se působí reverzní transkriptázou, čímž dojde k syntéze komplementárního řetězce. Reakční směs obsahuje 50 mM tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8,3, 9 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitolu, 50 mM každého ze tří neznáčených desoxyribonukleosid-trifosfátů, 1 mM nukleosidtrifosfátu značeného v poloze α radioaktivním fosforem při specifické aktivitě 1 až 10. curie na mM, 50 $\mu g/ml$ cDNA a 220 jednotek/ml reverzní transkriptázy. Reakční směs se inkubuje 120 minut při teplotě 45 °C. Reakce se zastaví přidáním sodné soli EDTA do množství 25 mM, směs se extrahuje fenolem a chromatografuje na přípravku Sephadex G-100, načež se vysráží ethanolem. Podíl reakčního produktu 500 až 1000 cpm se analyzuje elektroforézou na gelu, jak bylo popsáno v příkladu 1. Bylo možno prokázat heterodisperzní pás o délce 450 nukleotidů, srovnáním se standardními vzorky. Podíly reakčních produktů DNA z příkladu 1 a příkladu 2 byly pak nezávisle na sobě natráveny přebytkem restriční endonukleázy Hae III a analyzovány elektroforézou na gelu. Oba produkty byly uvedenou endonukleázou rozštěpeny, takže při elektroforéze na gelu bylo možno pozorovat dva radioaktivní pásy. Pás, který vznikl štěpením cDNA se dvěma řetězci měl přibližně produkty této délky jako pás, který vznikl v důsledku štěpení cDNA s jedním řetězcem.

Příklad 3

V tomto příkladu bude popsána vazba dekanukleotidových řetězců po zpracování enzymem Hind III na kryší cDNA s dvojitým řetězcem s Langenhansových ostrůvků, tak jak byla popsána v příkladu 2. Reakční produkt z příkladu 2 s dvojitým řetězcem v koncentraci 2 až 5 $\mu g/ml$ se uvede v reakci s 30 jednotkami SI nukleázy s aktivitou 1200 jednotek/ml (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana) v 0,03 M octanu sodném při pH 4,6 s 0,3 M chloridu sodného a 4,5 mM chloridu zinečnatého při teplotě 22 °C po dobu 30 minut, pak se směs dále inkubuje ještě 15 minut při teplotě 10 °C. Reakce byla postavena tak, že byl přidán tris-pufu do koncentrace 0,1 M, EDTA do koncentrace 25 mM a tRNA z *E. coli*, připravená způsobem podle publikace Ehrenstein G., Methods in Enzymology, S. P. Colowick a N. O. Kaplan, Eds., sv. 12A, str. 588 (1967) do

množství 40 $\mu g/ml$. Reakční směs se extrahuje fenolem, chromatografuje se na přípravku Sephadex G-100 a značené ^{32}P -cDNA se vysráží ethanolem. Tímto způsobem se získají ve vysokém výtěžku molekuly cDNA s párovými konci, kterých je zapotřebí k vazbě chemicky syntetizovaných dekanukleotidů. Dekamery Hind III byly připraveny způsobem, popsaným v publikaci Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D. a Itakura K., Science **196**, 177 (1977). Vazba dekamerů Hind III na cDNA se provádí inkubací při teplotě 14 °C v 60 mM tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 7,6 za přítomnosti 6,6 mM chloridu hořečnatého, 1 mM ATP, 10 mM dithiothreitolu, 3 mM dekameru Hind III o 10^5 cpm/pmol a T4 DNA ligázy v množství přibližně 500 jednotek/ml po dobu 1 hodiny reakční směs se pak zahřívá na teplotu 65 °C na 5 minut k inaktivaci ligázy. Přidá se chlorid draselný do koncentrace 50 mmolů, β -merkapt ethanol do koncentrace 1 mM a EDTA do koncentrace 0,1 mM, načež se směs natráví 150 jednotkami/ml Hsu I nebo Hind III endonukleázou po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Endonukleázy Hind III a Hae III je možno běžně získat (New England Biol-Labs, Beverly, Massachusetts). Reakční produkt se analyzuje elektroforézou na gelu stejným způsobem jako v příkladu 1, přičemž je možno prokázat vrchol, který odpovídá sledu přibližně 450 nukleotidů a mimoto fragmenty odštěpených dekamerů Hind III.

Příklad 4

V tomto příkladu bude popsána tvorba rekombinanty plasmidu a popis vlastností této rekombinanty po pomnožení. Odštěpí se plasmid pMB-9 DNA, připravený způsobem podle publikace Rodriguez R. L., Boliver F., Goodman H. M., Boyer H. W. a Betlach M., v ICN-UCLA Symposimu on Molecular and Cellular Biology, D. P. Wierlich, W. J. Rutter a C. F. Fox, Eds., (Academic Press, New York 1976) str. 471 až 477, v místě působení enzymu Hind III, přičemž se užije endonukleázy Hsu I, načež se směs podrobí působení alkalické fosfatázy typu BAPF (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey). Enzym je přítomen v reakční směsi v množství 0,1 jednotky/mikrogram DNA, reakční směs se inkubuje v 25 mM tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 8 po dobu 30 minut při teplotě 65 °C a pak se extrahuje fenolem k odstranění fosfatázy. Po vysrážení ethanolem se takto získaný plasmid DNA přidá k cDNA s obsahem zakončení Hind III v molárním poměru 3 moly plasmidu na 1 mol cDNA. Směs se inkubuje v tris-pufu o koncentraci 66 mM při pH 7,6, směs obsahuje dále 6,6 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu a 1 mM ATP. Inkubace trvá

hodinu při teplotě 14 °C za přítomnosti 50 jednotek/ml T4 DNA ligázy.

Výsledná směs se přidá přímo k suspenzi buněk *E. coli* X-1776, které byly připraveny následujícím způsobem: Buňky byly přesťovány až od hustoty 2×10^8 buněk/ml v 50 ml prostředí, které obsahovalo 10 g/litr Tryptonu, 5 g/litr extraktu z kvasnic, 10 g/litr chloridu sodného, 2 mM hydroxidu sodného, 100 µg/ml kyseliny diaminopimelové a 40 µg/ml thyminu při teplotě 37 °C. Buňky byly izolovány odstředěním 5 minut při 5000 g a při teplotě 5 °C, pak se znovu uvedou v suspenzi ve 20 ml chladného chloridu sodného o koncentraci 10 mM, znovu se odstředí a uvedou v suspenzi ve 20 ml pufru, který obsahuje 75 mM chloridu vápenatého, 140 mM chloridu sodného a 10 mM tris-pufu o pH 7,5, načež se buňky nechají stát 5 minut na ledu a pak se odstředí a znovu uvedou v suspenzi v 0,5 ml téhož pufru. Transformace se pak provádí tak, že se smísí 100 µl uvedené buněčné suspenze s 50 µl rekombinanty DNA o koncentraci 1 µg/ml. Směs se inkubuje při 0 °C po dobu 15 minut, pak při 25 °C po dobu 4 minuty a při 0 °C po dobu 30 minut. Pak se buňky přenesou na agarové plotny pro další pěstování.

Studium rekombinantních plasmidů se provádí při koncentraci tetracyklinu 5 µg/ml, zvolená rekombinanta, označená pAU-1 se izoluje a surový plasmid s 2 až 5 µg DNA, izolované z pAU-1 se natráví přebytkem endonukleázy Hsu I. Pak se přidá sodná sůl EDTA do koncentrace 10 mM a 10% sacharózy (hmot. %/objemová %) a směs se dělí za 8% polyakrylamidovém gelu. DNA má přibližně 410 párovaných bází. V obdobném pokuse bylo užito jako vektoru plasmidu pBR-322. Všechny podmínky odpovídaly svrchu uvedeným podmínkám s tím rozdílem, že konečná selekce rekombinantních klonů byla prováděna na plotnách, které

obsahovaly ampicilin v koncentraci 20 µg/ml.

Příklad 5

DNA z pAU-1 z příkladu 4 se dále čistí elektroforézou na 6% polyakrylamidovém gelu. Po vymytí z gelu se DNA značí inkubací s gama-³²P-ATP a s enzymem polynukleotidkinázou za podmínek, popsaných ve svrchu uvedené publikaci Maxama a Gilberta. Enzym katalyzuje účinnost svrchu uvedené skupiny radioaktivního fosfátu na 5'-zakončení DNA. Enzym se získává z *E. coli* způsobem, popsaným v publikaci Panet A. a další, *Biochemistry* **12**, 5045 (1973). Takto značená DNA se štěpí endonukleázou Hae III způsobem, popsaným v příkladu 2 a dva značené fragmenty obsahující 265 a 135 bází se oddělí na polyakrylamidovém gelu za podmínek, uvedených v příkladu 1. Takto izolované fragmenty se podrobí specifickému štěpení a analýze sledu bází způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Maxam a Gilbert. Sled, uvedený v následující tabulce 1 je založen na výsledku ze svrchu uvedených pokusů a na výsledcích obdobných pokusů, které byly provedeny při použití cDNA a vektorů, odvozených od col E1, například pMB-9 a pBR-322. Pokud jde o 5'-zakončení, zůstává neurčený sled o délce přibližně 50 až 120 nukleotidů a poly-dA segment na 3'-zakončení má různou délku. Tento sled je zatím nejpodrobnější dosažitelnou informací, je samozřejmé, že v průběhu příštích pokusů bude možná zapotřebí provést některé malé změny nebo budou objasněny další části řetězce. Odpovídající sled aminokyselin krysího proinsulinu I začíná na tripletu, který je označen 1 a končí na tripletu, označeném 86. Nejasnosti zůstávají stále v té oblasti sledu, která je podtržena přerušovanou čarou.

TABULKA 1

(nestanoveno) --- GCC CTG CTC CTC TGG GAG CCC AAG CCT GCT CAG GCT TTT GTC AAA CAG CAC CTT TGT
 10 GGT CCT CAC CTG GTG GAG GCT CTG TAC CTG TGT GGG GAA CGT GGT TTC TTC TAC ACA CCC AAC TCC CGT CGT
 20 GAA GTG GAG GAC CCG CAA GTG CCA CAA CTG GAG CTG GCT CGA GGC CCG GAG GCC GCG GAT CTT CAG ACC TGG GCA
 30 CTG GAG GTT GCC CGG CAG AAG CGT CCC ATT GTG GAT CAG TGC TGC ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAA CTG GAG
 40 AAC TAC TGC AAC TGA GTTCAATCAATTCCCGATCCACCCTCTGCAATGA ATAAACCCTTTGATGAGC-poly A
 50
 60
 70
 80

Příklad 1a

Opakuje se způsob podle příkladu 1, avšak koncentrace β -merkaptioethanolu se mění při homogenizaci buněk ostrůvků. Užití koncentrace β -merkaptioethanolu byly 0,05 M, 0,2 M, 0,6 M a 0,8 M. Při všech použitých koncentracích β -merkaptioethanolu bylo dosaženo týchž výsledků, to jest degradace mRNA ribonukleázou byla vyloučena.

Příklad 1b

Opakuje se způsob podle příkladu 1 a 1a, avšak mění se pH guanidiniumthiokyanátu a β -merkaptioethanolu při homogenizaci buněk ostrůvků. Bylo užito pH 6,0, 7,0 a 8,0. Při všech těchto hodnotách bylo dosaženo týchž výsledků, to znamená, že bylo možno zabránit degradaci mRNA ribonukleázou.

Příklad 3a

Dekanukleotidy pro vazbu v místě působení Eco RI se naváží na cDNA z příkladu 2 způsobem, popsaným v příkladu 3. Dekamery do místa působení Eco RI se připraví způsobem, popsaným ve svrchu uvedených publikaci Schellerové a dalších a mají sled 5'-CCGAATTCGG-3'. Po vazbě se produkt podrobí působení enzymu Eco RI za týchž reakčních podmínek, jaké byly popsány pro Hsu I nebo Hind III. Enzym Eco RI je možno běžně získat (New England Biolabs.). Reakční produkt byl analyzován elektroforézou na gelu stejným způsobem jako v příkladu 1 a bylo možno pozorovat vrchol, odpovídající sledu přibližně 450 nukleotidů kromě fragmentů odštěpených dekamerů.

Příklad 4a

i) Opakuje se způsob podle příkladu 4 při použití plasmidu pBR-322, připraveného podle publikace Bolivar a další, *Gene* **2**, 95, (1977) místo plasmidu pMB-9 DNA. Všechny podmínky byly zachovány s výjimkou závěrečné selekce rekombinantních klonů, která se provádí na plotnách s obsahem 20 μ g/ml tetracyklinu. Včleněná část se odstraní svrchu popsaným způsobem, čímž se získá DNA se 410 párem bází se sledem, uvedeným v tabulce 1.

ii) Opakuje se způsob podle příkladu 4 při použití plasmidu pBR-313 DNA, připraveného podle publikace Bolivar a další, *Gene* **2**, 75 (1977) místo plasmidu pMB-9 DNA. Všechny podmínky zůstávají zachovány s výjimkou konečné selekce rekombinantních klonů, která se provádí svrchu uvedeným způsobem, získá se DNA o 410 párech bází se sledem, uvedeným v tabulce 1.

iii) Opakuje se postup podle příkladu 4 při použití plasmidu pSC-101 DNA, připraveného způsobem podle publikace Cohen a

další, *Proc. Nat. Sci., USA*, **70**, 1293 (1973) místo plasmidu pMB-9 DNA. Všechny podmínky jsou zachovány včetně selekce rekombinantních klonů. Včleněná část se odstraní svrchu uvedených způsobem, získá se DNA o 410 párech bází se sledem, uvedeným v tabulce 1.

Příklad 4b

Opakuje se postup podle příkladu 4 a 4a s tím rozdílem, že se užije *E. coli* RRI nebo *E. coli* HB-101 místo *E. coli* X-1776. Všechny podmínky jsou jinak zachovány a bylo dosaženo týchž výsledků.

Příklad 4c

i) Jako vektor pro přenos se užije Charon 16A DNA, připravený způsobem podle svrchu uvedené Blattnerovy publikace. Zakončení se spojí inkubací při teplotě 42 °C na 60 minut v 0,1 M tris-HCl, pH 8,0 a 10 mM chloridu hořečnatého. Vektor se štěpí endonukleázou Eco RI v místě jejího působení a pak se zpracovává působením alkalické fosfatázy jako v příkladu 4. Po vysrážení ethanolom se vektor cDNA, zpracovaný fosfatázou přidá k cDNA s obsahem zakončení po štěpení enzymem Eco RI v molárním poměru 2 moly vektoru na 1 mol cDNA. Směs se váže působením T4 DNA ligázy jako v příkladě 4. Směs se přímo přidá k buněčné suspenzi *E. coli* X-1776, připravené způsobem podle příkladu 4 a transformace se provádí rovněž způsobem podle příkladu 4. Izolují se rekombinantní fágy a pěstují se na *lac*⁻ bakteriích na plotnách s obsahem 80 μ g/ml 5-chlor-4-brom-3-indolyl- β -D-galaktosidu (X6), izolují se rekombinantní fágy, které obsahují cDNA, včleněnou do místa pro působení Eco RI Charonu 16A a jsou příčinou vzniku bezbarvých plaků. Rekombinanta po selekci se izoluje a podrobí působení přebytku endonukleázy Eco RI a směs se analyzuje způsobem podle příkladu 4 a 5. Získá se DNA o 410 párech bází se sledem, uvedeným v tabulce 1. Směs je také možno užít ke tvorbě rekombinantních fágů *in vitro*, jak bylo popsáno v publikaci Sternberg N. a další, *Gene* **1**, 255 (1977). Vlastnosti rekombinantních fágů je možno prokázat také hybridizací *in situ*, která byla popsána v publikaci Benton W. D. a Davis R. W., *Science* **196**, 180 (1977).

ii) Charon 3A DNA, připravený způsobem podle svrchu uvedené Blattnerovy publikace, se užije jako vektor místo Charonu 16A DNA. Jinak jsou zachovány podmínky, popsané pro Charon 16A DNA. Selektce rekombinantních fágů se provádí pěstováním fágů na *lac*⁺ bakteriích na plotnách s obsahem X6 s izolací bezbarvých plaků a pak hybridizací nebo zpracováním pomocí restrikční endonukleázy, jak bylo rovněž popsáno ve svrchu uvedené Blattnerově publikaci. Včle-

něná část se odstraní svrchu uvedeným způsobem, čímž se získá DNA o 410 párech bází se sledem, uvedeným v tabulce 1.

iii) λ gtWES. λ B DNA, připravený způsobem podle svrchu uvedené publikace Tiemier a další, se užije jako vektor místo Charonu 16A. Všechny podmínky jsou jinak stejné jako v případě Charonu 16A. Selektce rekombinantních fágů se provádí hybridizací podle svrchu uvedené publikace Bentona a Davise. Včleněná část se odstraní, čímž se získá DNA o 410 párech bází se sledem, uvedeným v tabulce 1.

Příklad 4d

Opakuje se způsob podle příkladu 4c, avšak použije se *E. coli* RRB, *E. coli* HB-101, *E. coli* DP-50 nebo *E. coli* DP-50 SupF místo *E. coli* X-1776. Všechny podmínky jsou jinak stejné a získají se i stejné výsledky.

Příklad 6

Popisuje se izolace a čištění DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro lidský insulin a syntéza vektoru, obsahujícího DNA i vznik kmene mikroorganismů, který obsahuje tuto DNA jako část své genetické informace.

Buňky ostrůvků se izolují z lidské slinivky břišní způsobem podle příkladu 1. Tato tkáň se získá ze zemřelých lidí nebo z insulinomů. Buňky ostrůvků, smíšené z několika slinivek, se homogenizují ve 4 M guanidiniumthiokyanátu s obsahem 0,2 M β -merkaptoethanolu při pH 5,0, jak bylo popsáno v příkladu 1. Polyadenylovaná RNA se izoluje chromatograficky podle svrchu uvedené publikace Aviva a Ledera. Pak se připraví cDNA s jedním řetězcem použitím reverzní transkriptázy a hydrolyzovaná cDNA způsobem podle příkladu 1. Připraví se cDNA s dvojitým řetězcem podle příkladu 2 a natráví se nukleázou S1 způsobem podle příkladu 3. Podle téhož příkladu se přidají k cDNA s dvojitým řetězcem lidského insulinu látky, umožňující vazbu na zakončení při natrávení enzymem Hind III. Produkt se podrobí působení enzymu Hind III nebo Hsu I a analyzuje se způsobem, popsáným v příkladu 3. Je možno pozorovat vrchol odpovídající sledu 450 nukleotidů kromě fragmentů odštěpených dekamerů v místě působení Hind III. Pak se do plasmidu pMB-9 včlení cDNA lidského insulinu s obsahem zakončení, schopných vazby v místě působení enzymu Hind III. Tento postup se provádí podle příkladu 4 stejně jako transformace *E. coli* X-1776 a selektce rekombinantních plasmidů. Včleněná část se odstraní působením Hsu I a analyzuje podle příkladu 4. Získá se DNA o 450 nukleotidech. Je možno prokázat klonovaný lidský insulin, který obsahuje nukleotidy, které jsou kódem pro celý sled aminokyselin lidského insulinu. Sled aminokyselin v řetězci A je tento:

```

1
Gly—Ile—Val—Glu—Gln—Cys—Cys—
10
Thr—Ser—Ile—Cys—Ser—Leu—Tyr—Flu—
20
Leu—Glu—Asn—Tyr—Cys—Asn.

```

Aminokyseliny v řetězci B mají následující sled:

```

1
Phe—Val—Asn—Glu—His—Leu—Cys—
10
Gly—Ser—His—Leu—Val—Glu—Ala—
20
Leu—Tyr—Leu—Val—Cys—Gly—Glu—
30
Arg—Gly—Phe—Tyr—Thr—Pro—Lys—Thr.

```

Sled aminokyselin je číslován od zakončení, na němž se nachází volná aminoskupina.

Příklad 6a

i) Opakuje se příklad 6 s tím rozdílem, že se užije plasmid pBR-322 místo plasmidu pMB-9 DNA. Všechny podmínky jsou jinak totožné s podmínkami v příkladu 4a(i). Včleněná část se odstraní a získá se DNA o 450 nukleotidech se sledem, popsáným v příkladu 6.

ii) Opakuje se postup z příkladu 6, avšak užije se plasmid pBR-313 DNA místo plasmidu pMB-9 DNA. Všechny podmínky jsou jinak stejné jako v příkladu 4a(ii). Včleněná část se odstraní, čímž se získá DNA o 450 nukleotidech se sledem, popsáným v příkladu 6.

iii) Opakuje se postup z příkladu 6 při použití plasmidu pSC-101 DNA místo plasmidu pMB-9 DNA. Všechny podmínky jsou jinak stejné jako v příkladu 4a(iii). Včleněná část se odstraní, čímž se získá DNA o 450 nukleotidech se sledem, popsáným v příkladu 6.

Příklad 6b

Opakuje se postup podle příkladů 6 a 6a s tím rozdílem, že se užije *E. coli* RRI nebo *E. coli* HB-101 místo *E. coli* X-1776. Všechny podmínky jsou totožné a totožné jsou i získané výsledky.

Příklad 6c

Způsobem podle příkladu 6 se připraví cDNA lidského insulinu a zpracuje se chemicky syntetizovanými řetězci, navázanými v místě působení Eco RI podle příkladu 3a.

i) Včlení se cDNA lidského insulinu Eco RI do místa působení Eco RI Charonu 16A podle příkladu 4c(i). Izolují se rekombinantní fágy a včleněná část se odstraní podle příkladu 4c(i). Získá se DNA o 450 nu-

kleotidech se sledem, popsaným v příkladu 6.

ii) Včlenění se cDNA lidského insulinu se zakončeními pro vazbu v místě působení Eco RI do vektoru Charonu 3A podle příkladu 4c(ii). Rekombinantní fágy se izolují a analyzují podle příkladu 4c(ii), čímž se získá DNA o 450 nukleotidech se sledem, popsaným v příkladu 6.

iii) Plasmid λ gtWES. λ B se užije jako vektor pro přenos cDNA lidského insulinu po zpracování Eco RI způsobem podle pří-

kladu 4c(iii). Izolují a analyzují se rekombinantní fágy. Včleněná část se odstraní, čímž se získá DNA o 450 nukleotidech se sledem, popsaným v příkladu 6.

Příklad 6d

Opakuje se příklad 6c, užije se E. coli RRI, E. coli HB-101, E. coli DP-50 nebo E. coli DP-50 SupF místo E. coli X-1776. Užije se týchž podmínek a získají se tytéž výsledky.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin tak, že se izolují buňky s obsahem mRNA, která je kódem pro insulin, z těchto buněk se extrahuje mRNA, načež se čistí a z této mRNA se syntetizuje cDNA za vzniku cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin a takto získaná cDNA se uvede v reakci s vektorem pro přenos DNA za vzniku vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin, vyznačující se tím, že se z buněk s obsahem mRNA, která je kódem pro insulin, extrahuje tato mRNA homogenizací buněk za přítomnost inhibitoru ribonukleázy, který obsahuje guanidiniumthiokyanát a β -merkaptoethanol při pH 5,0 až 8,0, čímž se brání degradaci mRNA působením ribonukleázy, načež se cDNA uvede v reakci s vektorem pro přenos DNA ve dvou stupních, přičemž v prvním stupni se enzymaticky hydrolyzuje vektor pro přenos DNA působením restrikční endonukleázy ze skupiny Hidn III nebo Hsu I za vzniku vektoru pro přenos DNA s reaktivními zakončeními, která jsou schopna vzájemného spojení nebo spojení s cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin a ve druhém stupni se en-

zymaticky spojí vektor pro přenos DNA a cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin při použití DNA-ligázy za přítomnosti adenosintrifosfátu a za vzniku vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin.

2. Způsob podle bodu 1 pro výrobu vektoru pro přenos DNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin, vyznačující se tím, že se po prvním stupni ještě enzymaticky hydrolyzuje jakákoli 5'-fosfátová koncová skupina na vektoru pro přenos DNA s reaktivními zakončeními za vzniku předem zpracovaného vektoru pro přenos DNA s reaktivními zakončeními, která nejsou schopna opětového vzájemného spojení, avšak jsou schopna spojení s cDNA se sledem nukleotidů, který je kódem pro insulin.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se užije inhibitoru ribonukleázy s obsahem 4 M guanidiniumthiokyanátu s 0,05 až 1,0 M β -merkaptoethanolu.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se užije inhibitoru ribonukleázy s obsahem 0,2 M β -merkaptoethanolu.

5. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že enzymatická hydrolýza se provádí působením alkalické fosfatázy.

