



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

238646
(11) (B2)

(22) Přihlášeno 23 03 81
(21) [PV 6231-83]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 24 03 80
(133296) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 16 01 85

(45) Vydáno 15 05 87

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00
C 07 H 21/04
//A 61 K 37/24

(72)

Autor vynálezu

KLEID DENNIS G., SAN MATEO, YANSURA DANIEL G., SAN FRANCISCO,
HEYNEKER HERBERT L., BURLINGAME (Sp. st. a.),
MIOZZARI GIUSEPPE F., AUGARTEN-RHEINFELDER (Švýcarsko)

(73)

Majitel patentu

GENENTECH, INC., SOUTH SAN FRANCISCO (Sp. st. a.)

(54) Způsob štěpení dvojvláknové DNA v kterémkoliv daném bodě

1

2

Způsob štěpení dvojvláknové DNA v kterémkoliv daném bodě spočívající v tom, že a) dvojvláknová DNA se převede v okolí obklopujícím daný bod na jednovláknovou DNA, b) na jednovláknový úsek vytvořený ve stupni a) se hybridizuje komplementární délka jednovláknového DNA priméru, přičemž 5' konec priméru leží na opačné straně nukleotidu připojeného k zamýšlenému štěpícímu místu, c) obnoví se ta část druhého vlákna eliminovaného ve stupni a), která leží v 3' směru od uvedeného priméru, reakcí s DNA polymerázou v přítomnosti trifosfátů desoxynukleotidů obsahujících adenin, thymín, guanin a cytosin a d) digeruje se zbývající jednovláknová délka DNA, která vyčnívá za zamýšleným štěpícím místem.

Nástup technologie využívající rekombinované kyseliny desoxyribonukleové (=DNA) umožnil kontrolovanou bakteriální produkci enormní řady užitečných polypeptidů. V současné době jsou již k dispozici bakterie modifikované touto technologií, které umožňují výrobu takových polypeptidických produktů, jako jsou somatostatin (viz K. Itakura a spolupracovníci, *Science* 198, 1056 /1977/, komponenty A a B řetězců lidského insulinu (viz D. V. Goeddel a spolupracovníci, *Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA* 76, 106 /1979/) a lidský růstový hormon (viz D. V. Goeddel a spolupracovníci, *Nature* 281, 544 /1979/). Nověji bylo rekombinačních DNA technologií použito k bakteriální produkci thymosinu alfa 1, imunopotenciační substance produkované thymem (publikována přihláška evropského patentu č. 0035454).

Význam této technologie je tak velký, že bakteriálně lze skutečně vyrábět každý potřebný polypeptid, přičemž je v dosahu kontrolovaná výroba hormonů, enzymů, protilátek a vakcín proti nejrozličnějším onemocněním. Citované publikace, ve kterých jsou podrobněji popsány shora uvedené typické příklady bakteriální výroby polypeptidů, jsou na tomto místě uváděny, stejně tak, jako další níže uvedené publikace, za účelem bližšího objasnění podstaty vynálezu.

Výkonným útvarem rekombinační DNA technologie je plasmid, chromosomů prostá smyčka dvouvláknové DNA nalezená v bakteriích, často v mnohonásobných kopiích v jedné bakteriální buňce. V informaci zakódované v plasmidické DNA jest včleněna informace potřebná k reprodukci plasmidu do dceřinné buňky (tzv. „replikón“) a obvykle jedna nebo více selekčních charakteristik, jako je rezistence vůči antibiotikům, které umožňují, že klóny hostitelské buňky obsahující plasmid, který je předmětem našeho zájmu, mohou být rozpoznány, selektivně vybrány a přednostně pěstovány v selektivním růstovém prostředí.

Užitečnost bakteriálních plasmidů spočívá ve skutečnosti, že je lze specificky štěpit jednou nebo druhou restriční endonukleázou, neboli „restričním enzymem“, přičemž každá z těchto endonukleáz rozpoznává na plasmidické DNA odlišné místo. Po rozštěpení lze vpravit do plasmidu heterologické geny nebo fragmenty genů buď přímým připojením v místě rozštěpení, nebo připojením na rekonstruovaných koncích sousedících s místem rozštěpení. Pod pojmem „heterologický“ používaným v popisu vynálezu se rozumí gen, který se obvykle nenachází v bakteriích *E. coli*, nebo polypeptidická sekvence, která není těmito bakteriemi obvykle produkována, zatímco pojem „homologický“ se vztahuje na gen nebo polypeptid, který je produkován divoce rostoucím typem bakterií *E. coli*. Rekombinace DNA se provádí vně bakterií, ale vzniklý „rekombinovaný“ plasmid lze zavést do bakterií postupem známým jako transformace a kultivací zís-

kaného transformantu lze připravit velká množství rekombinovaného plasmidu obsahujícího heterologický gen. Kromě toho, podle toho kam se gen vhodně zavede vzhledem k částem plasmidu, které řídí transkripci („přepis“) a translaci („překlad“) zakódovaných DNA informací, lze získaný vylučovací prostředek použít k aktuální produkci polypeptidické sekvence, pro kterou je vestavěný gen kódován; tento postup se v popisu vynálezu označuje jako vylučování (exprese).

Expresa je iniciována v oblasti známé jako promotor, která se vyznačuje tím, že je místem připojení RNA-polymerázy. V některých případech, jako v níže diskutovaném případě tryptofánového (*trp*) operonu, jsou oblasti promotoru překryty oblastmi „operátoru“ a vytváří se kombinovaný promotor-operátor. Operátory jsou sekvence DNA, které lze rozpoznat přítomností tak zvaných represorových proteinů, které slouží k regulování frekvence iniciace transkripce u specifického promotoru. Polymerasa se pohybuje podél řetězce DNA, transkribuje informaci obsaženou v kódovacím vlákně DNA z jeho 5' místa na 3' konec informační kyseliny ribonukleové (m-RNA) a tyto informace ihned překládá do polypeptidické sekvence, která má takové pořadí aminokyselin, které je v DNA zakódované. Každá aminokyselina je zakódována jediným tripletem nukleotidů, neboli „kodónem“, pro který je v popisu vynálezu používán termín „strukturální gen“ a označuje tu část DNA, ve které je zakódována sekvence aminokyselin vyloučeného polypeptidického produktu. Poté, co se RNA-polymeráza naváže na promotor, transkribuje nejprve nukleotidy kódované na ribozómové vazebné místo, pak dojde k iniciaci translace neboli k signálu „start“ (obvyčejně kodónem ATG, který se ve vzniklé informační RNA stane AUG) a poté k translaci nukleotidických kodónů do samostatného strukturálního genu. Na konec strukturálního genu se transkribují tak zvané stop-kodóny a polymeráza může poté vytvářet další sekvenci informační RNA, která vzhledem k přítomnosti stop-signálu zůstává nepřenesena do ribozómů. Ribozómy se naváží na vazebné místo připravené na informační RNA, v bakteriích obvykle poté, co se mRNA vytvoří, a samy produkují polypeptidy podle zakódované sekvence, počínaje start signálem translace a konče zmíněným stop signálem. Žádaný produkt se tvoří jen tehdy, když jsou sekvence kódující vazebné místo ribozómů umístěny správně vzhledem k AUG iniciačnímu kodónu a když všechny zbývající kodóny následují za iniciačním kodónem ve fázi. Vzniklý produkt lze získat lýzou hostitelské buňky a jeho oddělením od ostatních bílkovin vhodnou čistící metodou.

Polypeptidy získané expresí za použití rekombinační DNA technologie mohou být zcela heterologické, jako v případě přímého vylučování lidského růstového hormonu,

nebo se alternativně mohou skládat z heterologického polypeptidu, na který je navázána (fúzována) alespoň část aminokyselinové sekvence homologického peptidu, jako v případě přípravy meziproduktů pro somatostatin a složek lidského insulinu. V posléze uvedeném případě obsahuje například homologický peptid navázanou část aminokyselinové sekvence pro betagalaktosidázu. V takovýchto případech je žádaný bioaktivní produkt biologicky inaktivován navázaným homologickým polypeptidem do té doby, dokud není posléze uvedený peptid odštěpen působením extracelulárních prostředků. Fuzované bílkoviny, jako ty, které byly zmíněny výše, lze pokládat za prekursory žádaných bílkovin, které se z nich dají získat vysoce specifickým štěpením, jako například působením bromkyanu obsahují-li methionin, nebo alternativně enzymatickým štěpením; viz například britský patent 2 007 676 A.

Má-li rekombinační DNA technologie splnit očekávané naděje, musí se nalézt systémy, které optimalisují expresi vložených genů a umožňují získávat žádané polypeptidické produkty ve vysokých výtěžcích. Beta-laktamázové a laktózoové promotor-operátorové systémy, kterých se v minulosti nejběžněji používalo, poněvadž byly užitečné, nevyužívaly plně kapacitu technologie z hlediska výtěžků. Bylo třeba nalézt prostředek pro bakteriální vylučování peptidů, který by umožňoval kontrolovatelnou expresi žádaných polypeptidických produktů ve vysokých výtěžcích.

Tryptofan je aminokyselina produkovaná bakteriemi a používaná jimi jako komponenta homologických polypeptidů. Biosyntéza probíhá následujícím způsobem: kyselina chorismová → kyselina antranilová → kyselina fosforibosylantranilová → CDRP [enol-1-(o-karboxyfenylamino)-1-desoxy-D-ribulosa-5-fosfát] → indol-3-glycerolfosfát a posléze samotný tryptofan. Enzymatické reakce této biosyntézy jsou katalysovány produkty tryptofánového operonu, což je polycitrónový úsek DNA, který je transkribován pod řízením trp-promotorového-operátorového systému. Vzniklá polycitrónová informační RNA kóduje tak zvané hlavní tryptofanové sekvence a pak, v níže uvedeném pořadí, polypeptidy označované zde jako trp E, trp D, trp C, trp B a trp A. Tyto polypeptidy v různé míře katalysují a kontrolují individuální stupně biosyntesy tryptofanu z kyseliny chorismové.

V divokém typu bakterií *E. coli* je tryptofánový operon pod vlivem alespoň tří různých forem regulačních kontrol. V případě represe promotoru-operátoru působí sám tryptofan jako korepresor, váže se na svůj aporepresor a vytváří aktivní represorový komplex, který se ihned poté váže na operátor a ukončuje biosyntézu v jejím celku. Za druhé, mechanismem inhibice zpětné vazby, se tryptofan váže na komplex trp E

a trp D polypeptidů a zamezuje tím jejich účast na biosyntéze. Posléze se provádí regulace mechanismem známým jako útlumový faktor, pod kontrolou „útlumové oblasti“ genu, oblasti, která je uvnitř hlavní trp-sekvence. Viz obecně G. F. Miozzari a spolupracovníci v časopise *J. Bacteriology* 133, 1457 (1978); monografie „The Operon“, str. 263 až 302, vydavatelé Miller a Reznikoff, Cold Spring Harbor Laboratory (1978); F. Lee a spolupracovníci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4365 (1977); a K. Bertrand a spolupracovníci, *J. Mol. Biol.* 103, 319 (1976). Zdá se, že stupeň útlumu je ovládán intracelulární koncentrací tryptofanu, a u divokého typu bakterií *E. coli* ukončuje útlumový článek expresi přibližně v devíti z deseti případů, pravděpodobně vytvářením sekundární struktury neboli „terminační smyčky“ v informační RNA, což má za následek, že se RNA-polymeráza předčasně vyprostí z připojení k DNA.

Jiní pracovníci použili trp operon za účelem, aby získali nějaké měřítko pro expresi heterologických peptidů. Tento pracovník směr se pokouší řešit problémy represe a útlumu přidáváním kyseliny indolylakrylové, induktoru a analogu, který soutěží s tryptofanem o trp represory v molekule, a směřuje k vyvolání deprese pomocí kompetitivní inhibice. Induktor zmenšuje současně útlum inhibicí enzymatické konverse indolu na tryptofan a tak účinně zbavuje buňky tryptofanu. Výsledkem je, že více polymeráz úspěšně transkribuje přes útlumový článek. Tento přístup se však zdá problematický z hlediska důsledného dokončení translace a provedení ve vysokém výtěžku, neboť syntéza za bílkovinnové sekvence obsahující tryptofan se předběžně ukončí v důsledku nedostatku využitelného tryptofanu. Účinné snížení útlumu při tomto přístupu jest ovšem úplně závislé na silném tryptofánovém hladovění.

Vynález se věnuje problémům spojeným s represí a útlumem biosyntézy tryptofanu odlišným způsobem. Předmětem vynálezu je

1. způsob získávání plasmidických vylučovacích prostředků určených pro přímou expresi heterologických genů z trp promotoru—operátoru;

2. způsoby získávání plasmidických vylučovacích prostředků určených pro expresi, z tryptofánového operátoru-promotoru, specificky štěpitelných polypeptidů kódovaných fúzemi homologických a heterologických genů, a

3. způsob výroby heterologických polypeptidů bakteriální expresí, vyznačující se tím, že ho lze provádět kontrolovatelně, účinně a ve vysokých výtěžcích, a způsob výroby potřebných prostředků.

Podle vynálezu lze připravovat nové plasmidické vylučovací prostředky určené pro bakteriální výrobu heterologických polypeptidických produktů, přičemž zmíněné plasmidické prostředky mají sekvenci dvojvlák-

nové DNA zahrnující, ve fázi od prvního 5'-konce k druhému 3'-konci kódovacího řetězce, trp-promotor-operátor, nukleotidy kódující na hlavní trp vazebné místo ribozómu a nukleotidy kódující iniciaci translace pro expresi strukturálního genu, ve kterém je zakódovaná aminokyselinová sekvence heterologického polypeptidu. Uvedená DNA sekvence neobsahuje ani trp útlumovou oblast, ani nukleotidy kódující na trp E ribozómové vazebné místo. Místo toho je trp hlavní ribozómové místo účinně využito k tomu, aby vykonávalo expresi informací zakódovaných ve vloženém genu.

Buňky se transformují přidáním plasmidů připravených způsobem podle vynálezu a obsahujících trp promotor-operátor, kterým však chybí útlumový článek, a kultivují se v přítomnosti záměrně přidaného tryptofanu. Použití živného prostředí bohatého na tryptofan umožňuje, aby dostatek tryptofanu v podstatě úplně potlačil interakce trp promotor-operátoru s trp-represorem, takže růst buněk může postupovat bez inhibice předčasným vylučováním velkých množství heterologických polypeptidů zakódovaných ve vloženém genu, jinak pod kontrolou trp promotorového-operátorového systému. Když se rekombinovaná kultura vypěstuje na úrovni vhodné pro průmyslovou produkci polypeptidu, vnější zdroj tryptofanu se naopak odstraní a buňky se nechají odkázány pouze na tryptofan, který mohou samy produkovat. Výsledkem je slabé omezení tryptofanu, v důsledku toho je potlačena biosyntéza a dojde k vysoce účinnému vylučování vloženého heterologického genu, nebráněné útlumem, protože útlumová oblast je ze systému vypuštěna. Tímto způsobem nejsou buňky nikdy příliš zbaveny tryptofanu a všechny bílkoviny, ať obsahují tryptofan nebo ne, mohou být produkovány ve vysokých výtěžcích.

Vynález rovněž zahrnuje způsoby dvojvláknové DNA vhodnými prostředky v kterémkoliv žádaném místě, dokonce i v nepřítomnosti restriktivního enzymového místa; uvedená pracovní technika je vhodná, mimo jiné, k sestrojení trp-operonů majících deletovaný útlumový článek, a to jiným způsobem než byly získávány dříve selekcí mutantů.

Předmětem vynálezu je tedy způsob štěpení dvojvláknové DNA v kterémkoliv daném bodě, jehož podstata spočívá v tom, že

a) dvojvláknová DNA se převede v okolí obklopujícím daný bod na jednovláknovou DNA,

b) na jednovláknový úsek vytvořený ve stupni a) se hybridizuje komplementární délka jednovláknového DNA priméru, přičemž 5' konec priméru leží na opačné straně nukleotidu připojeného k zamýšlenému štěpícímu místu,

c) obnoví se ta část druhého vlákna eliminovaného ve stupni a), která leží v 3' směru od uvedeného priméru, reakcí s DNA

polymerázou v přítomnosti trifosfátů desoxynukleotidů obsahujících adenin, thymín, guanin a cytosin a

d) digeruje se zbývající jednovláknová délka DNA, která vyčnívá za zamýšleným štěpícím místem.

Posléze vynález umožňuje výrobu různých užitečných meziproduktů a konečných produktů, včetně specificky štěpitelných heterologicky-homologických fúzovaných bílkovin, které jsou stabilizovány vůči odbourávání za podmínek vylučování.

Způsob podle vynálezu, jeho podstata a výhody jsou blíže objasněny v následujícím podrobném popisu a na přiložených výkresech na obr. 1 až 13.

Obr. 1 a 2 ilustrují výhodné schéma přípravy plasmidů schopných exprese heterologických genů ve formě fúzí s částí trp D polypeptidů; z těchto fúzovaných bílkovin je lze později specificky odštěpit.

Obr. 3 znázorňuje výsledek dělení buněčné bílkoviny obsahující homologické (trp D') a heterologické (somatostatin nebo thymosin α 1) fúzované bílkoviny, za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Obr. 4, 5 a 6 znázorňují postupně stupně výhodného schématu pro sestrojení plasmidu schopného přímého vylučování heterologického genu (lidského růstového hormonu -HGH-gen) za kontroly trp promotorového-operátorového systému.

Obr. 7 znázorňuje výsledek dělení buněčné bílkoviny obsahující lidský růstový hormon (HGH) přímo vylučovaný za kontroly trp-promotorového-operátorového systému, za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Obr. 8, 9 (a až b) a 10 znázorňují postupně stupně výhodného schématu pro sestrojení plasmidů schopných vylučování heterologických genů (ve znázorněném případě somatostatinu) ve formě fúzí s částí trp E polypeptidu; z těchto fúzovaných bílkovin lze heterologické peptidy později specificky odštěpit. Na obr. 9a (a) znamená 5' → 3' digescí komplementárního vlákna LE' strukturálního genu lambda-exonukleázou, (b) znamená připojení oligonukleotidu 26, ³²pCCTGTGCATGAT na vzdálenější konec LE' kódujícího vlákna a (c) znamená Klenowovu polymerázu I (5' → 3'-polymeráza) + +4 dNTP (a 3' → 5' exonukleáza).

Obr. 11 znázorňuje výsledky dělení buněčné bílkoviny obsahující homologické (trp E) a heterologické fúzované bílkoviny vhodné pro produkci například somatostatinu, thymosinu alfa 1, lidského proinsulinu A a B řetězců lidského insulinu, za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Obr. 12 a 13 znázorňují postupně stupně způsobu, při kterém plasmid vytvořený postupem znázorněným na obr. 8 až 10 včetně je zpracován tak, aby vytvořil systém, ve kterém se mohou zaměnitelně vylučovat jiné heterologické geny ve formě fúzí s polypeptidickými sekvencemi trp E peptidu.

Na uvedených obrázcích jsou z důvodu jasnosti ilustrace zobrazeny ve většině případů jen kódovací řetězce dvojvláknového plasmidu a lineárních DNA. Geny kódující resistenci vůči antibiotikům jsou označeny ap^R (resistence vůči ampicilinu) a tc^R (resistence vůči tetracyklinu). Označení tc^R znamená gen pro tetracyklinovou resistenci, který není pod kontrolou promotorového-operátorového systému, takže plasmidy obsahující tento gen nemohou být nikdy citlivé na tetracyklin. Legenda „ ap^{SR} “ značí ampicilinovou citlivost vzniklou vynecháním části genu kódující ampicilinovou citli-

vost. Plasmidické promotory a operátory jsou označeny „p“ a „o“. Písmena A, T, G a C označují nukleotidy obsahující base adenin, thymin, guanin a popřípadě cytosin. Význam dalších legend uvedených v obrázcích bude vysvětlen v následujícím textu.

Výhodná provedení způsobu podle vynálezu popsaná níže zahrnují použití řady běžně dostupných restričních endonukleáz identifikovaných v dalším popisu; jejich odpovídající rozpoznávací sekvence a vzory štěpení (místa štěpení jsou označena šipkami) jsou znázorněny níže:

Označení endonukleázy	Nukleotidové sekvence a místo štěpení	Označení endonukleázy	Nukleotidové sekvence a místo štěpení
XbaI	↓ TCTAGA	TaqI	↓ TCGA
EcoRI	AGATCT ↓ GAATTC CTTAAG ↑	HindIII	AGCT ↓ AAGCTT TTCGAA ↑
BglII	↓ AGATCT TCTAGA ↓ GAGCTG	HpaI	↓ GTTAAC CAATTG ↑
PvuII	GTCGAC ↓ GGATCC	PstI	↓ CTGCAG GACGTC ↑
BamHI	CCTAGG ↑		

Když jsou body štěpení prostorově umístěny odděleně na příslušných řetězcích, jsou rozštěpené konce „lepivé“ (zachytné), tj. schopné opětovné anelace (uzavření kruhu) nebo schopné připojení na jiné komplementární DNA zakončené lepivým koncem, podle Watsonova-Crickova principu párování basí (A s T a G s C) na principu drážky a čepu.

Některé restriční enzymy, jako shora uvedený HpaI a PvuII štěpí řetězec DNA za vzniku „otupených“ konců. Shora uvedené nukleotidové sekvence jsou znázorněny v soulase s běžnými konvencemi: vrchní řetězec je řetězec kódující bílkoviny a při postupu z leva do prava po zmíněném řetězci jde o pohyb z jeho 5'-konce na 3'-konec, tj. ve směru transkripce od „bližšího“ ke „vzdálenějšímu“ bodu.

Posléze v soulase s konvencemi, symbol „Δ“ značí delecí (vynechání určité sekvence). Tak například označení plasmidu „Δ EcoRI-XbaI“ popisuje plasmid, ze kterého byla odstraněna nukleotidická sekvence

mezi místy působení restričních enzymů EcoRI a XbaI digescí těmito enzymy. Pro lepší názornost jsou některé delecce označena čísly.

Tak například, počínaje prvním párem basí („bp“) rozpoznávacího místa enzymu EcoRI, který předchází genu pro tetracyklinovou resistenci v rodičovském plasmidu pBR 322, značí „Δ 1“ vynechání párů bp 1 až 30 (tj. Δ EcoRI až HindIII) a z toho vyplývající eliminaci tetracyklinového promotorového-operátorového systému; „Δ 2“ značí delecí bp 1 až 375 (tj. Δ EcoRI až BamHI) a z toho vyplývající odstranění jak tetracyklinového promotoru — operátoru, tak strukturálního genu, který kóduje tetracyklinovou resistenci; a „Δ 3“ značí vynechání sledu bp 3 611 až 4 359 (tj. Δ PstI až EcoRI) a v důsledku toho eliminaci ampicilinové resistance. Symbolu „Δ 4“ se používá k označení odstranění sekvence bp ~ 900 až ~ 1 500 z trp operonového fragmentu 5 (viz obr. 1) a v důsledku toho eliminaci strukturálního genu pro polypeptid trp D.

Hlavní trp sekvence je vytvářena páry basí (bp) 1 až 162, počínaje od výchozího bodu pro trp mRNA. Čtrnáct aminokyselin uvedeného hlavního trp polypeptidu je zakódováno páry bp 27 až 71, následujících za ATG nukleotidy, které kódují startovní signál pro translaci.

Oblast trp útlumového článku zahrnuje postupně GC-bohaté a AT-bohaté nukleotidové sekvence, ležící mezi bp 114 až 156, a útlum je zřejmě způsobován mRNA nukleotidy zakódovanými páry ~ 134 až 141 hlavní sekvence. Aby došlo k expresi heterologického polypeptidu za řízení trp hlavním ribozómovým vazebným místem a současně aby se zamezilo útlumu, musí být sledována následující kritéria:

1. páry basí 134 až 141 nebo ještě následující musí být vynechány;

2. ATG kodón vloženého genu musí být umístěn ve správné relaci vzhledem k ribozómovému vazebnému místu, jak je popsáno v literatuře (viz například kapitulu J. A. Steitze „Genetické signály a nukleotidické sekvence v informační RNA“ v monografii „Biological Regulation and Control“ [vydávatel R. Goldberger], Plenum Press, N. Y. /1978/);

3. mají-li být produkovány homologicko-heterologické fúzované bílkoviny, musí zůstat dostupný startovní signál pro translaci homologické polypeptidické sekvence, a kodóny pro homologickou část fúzované bílkoviny musí být včleněny ve fázi, aniž by zasahovaly do stop-signalů pro translaci.

Tak například vynecháním všech párů basí uvnitř hlavní sekvence, vzdálenějších od bp 70, se odstraní oblast útlumu, ponechá se ATG kodón, který kóduje startovní signál pro translaci a eliminuje se mezi nimi ležící stop-signal pro translaci kódovaný sekvencí TCA (bp 69 až 71), eliminací nukleotidu A a následujících nukleotidů. Vynechání takové sekvence má za následek expresi fúzovaných bílkovin začínajících hlavním polypeptidem a končících proteinem zakódovaným příslušnou heterologickou vložkou, a včetně vzdálenější oblasti jednoho z polypeptidů za vedoucím trp-operonem, určeného rozsahem vynechání sekvence ve směru k 3'-konci. Tak například vynechání zasahující do E genu vede k expresi homologického prekursoru obsahujícího sekvenci L a vzdálenější oblast sekvence E (za konečným bodem vynechané

sekvence), fúzovaných se sekvencí kódovanou následující vložkou, a tak dále.

Dva zvláště vhodné plasmidy, ze kterých byla odstraněna oblast útlumu, jsou plasmidy pGM 1 až pGM 3; viz publikaci G. F. Mozzariho a spolupracovníků v časopise *J. Bacteriology* 133, 1457 (1978). Tyto plasmidy mají popřípadě delece trp Δ LE 1413 a trp Δ LE 1417 a vylučují (za kontroly trp-promotoru-operátoru) polypeptidy obsahující přibližně prvních šest aminokyselin hlavní trp sekvence a vzdálenější oblasti polypeptidu E.

V nejvýhodnějším případě, u plasmidu pGM 1, je vylučována pouze asi poslední třetina polypeptidu E, zatímco plasmid pGM 3 vylučuje téměř celou vzdálenější polovinu kodónů polypeptidu E. Bakterie *E. coli* K-12, kmen W 3110 tna 2^{-} trp $^{-}$ 102 obsahující plasmid pGM 1 jsou uloženy v americké sbírce typových kultur (American Type Culture Collection) pod označením ATCC číslo 31622. Plasmid pGM 1 se může z uvedeného kmene odstranit obvyklým způsobem a lze ho pak používat v níže popsaných postupech.

Alternativně lze delece některých sekvencí provádět způsoby podle vynálezu, které umožňují specifické štěpení dvojvláknové DNA na kterémkoliv žádaném místě. Jeden příklad této štěpící pracovní techniky je zřejmý z příkladu 4 uvedeného níže. Tak například se dvojvláknová DNA rozdělí na jednotlivá vlákna DNA v okolí oblasti zamýšleného místa štěpení, například reakcí s lambda-exonukleázou.

K takto předem vytvořené jednovláknové části DNA se pak hybridizuje syntetický nebo jiný jednovláknový DNA primér, pomocí Watsonova-Crickova principu párování basí, přičemž sekvence priméru musí být účelně taková, aby zaručovala, že jeho 5'-konec bude kotermínální s nukleotidem na prvním vlákně DNA právě před určeným bodem štěpení.

Primér se pak prodlouží směrem k 3'-konci reakcí s DNA polymerázou, a tak se znovu sestaví ta část původní dvouvláknové DNA, která je před určeným místem štěpení a která byla v prvním stupni ztracena. Současně nebo poté se část prvního vlákna DNA za určeným místem štěpení odstraní digescí vhodným enzymem. Postup je shrnut graficky v následujícím schématu, ve kterém „v“ označuje určené místo štěpení DNA:

- a) v určené místo štěpení řetězce DNA „v“
- b) v vytvoření jednovláknové DNA v okolí „v“
- c) v hybridizace priméru
- d) v prodloužení priméru
- e) v digesce jednovláknové DNA za místem štěpení „v“.

Při výhodném způsobu provedení se stupně d) a e) znázorněného postupu provádějí současně, za použití polymerázy, která současně digeruje vyčnívající jednovláknový konec DNA ve směru $3' \rightarrow 5'$ a prodlužuje primér ve směru $5' \rightarrow 3'$ (v přítomnosti dATP, dGTP, dTTP a dCTP).

Vhodným materiálem pro uvedený účel je Klenowova polymeráza I, tj. fragment získaný proteolytickým štěpením DNA polymerázy I, který vykazuje $5' \rightarrow 3'$ polymerizační účinnost a $3' \rightarrow 5'$ exonukleolytickou aktivitu rodičovského enzymu, ale kterému chybí její $5' \rightarrow 3'$ exonukleolytická účinnost; viz A. Kornberg v monografii „DNA Synthesis“, str. 98, W. H. Freeman and Co., SFO (1974).

Za použití právě popsaného postupu lze provádět delece útlumové oblasti z plasmidu obsahujícího trp-operón, po jeho předchozí linearizaci, například štěpením v místě žádané restrikce, položeném níže od bodu, ve kterém má být molekula zakončena otupěným koncem (viz shora uvedené „v“). Opětovné uvedení plasmidu do kruhového tvaru následující po odstranění útlumové oblasti lze uskutečnit například navázáním „tupého“ konce molekuly nebo jinými způsoby, které jsou odborníkům známy.

Ačkoliv způsob podle vynálezu zahrnuje přímé vylučování heterologických polypeptidů na řízení trp-promotorem-operátorem, týká se přednostní způsob jeho provedení vylučování fúzovaných bílkovin obsahujících jak homologické, tak heterologické sekvence, přičemž posléze uvedené polypeptidy se s výhodou dají odštěpit od prvních v extracelulárních prostředcích.

Zvláště výhodnými jsou takové fúze bílkovin, ve kterých se homologická část skládá z jedné nebo více aminokyselin z trp hlavního polypeptidu a asi z jedné třetiny nebo více trp E aminokyselinové sekvence (ze vzdálenějšího konce). Takto získané fúzované bílkoviny se jeví podstatně stálejší vůči degradaci za podmínek exprese.

Bakterii *E. coli* K-12, kmene W 3110 tna 2^- trp $^-$ A 102 (pGM1), ATCC číslo 31622, lze používat k rozšiřování kmenů plasmidu pGM1, kterých se podle vynálezu s výhodou používá k sestavování trp promotorových-operátorových systémů zbavených útlumo-

vé oblasti. Tento kmen je v přítomnosti anthranilátu fenotypicky trp $^+$ a lze ho pěstovat na minimální živné půdě, jako například na půdě LB doplněné 50 μ g/ml anthranilátu.

Všechny bakteriální kmeny používané při expresi řízené trp promotorem-operátorem podle vynálezu jsou trp represory $^+$ („trp R $^{+}$ “) jako v případě divokého typu bakterií *E. coli*, čímž je zajištěna represe až do doby zamýšleného heterologického vylučování.

Při výhodném způsobu provedení se rekombinace DNA provádí v bakteriích *E. coli* K-12, kmenu 294 (zakončení A, thi $^-$, hrs $^-$, hsm $_{K}^+$), ATCC číslo 31446, což je bakteriální kmen, jehož membránové charakteristiky usnadňují transformace. Plasmidy produkující heterologické polypeptidy, vypěstované v kultuře kmene 294, se běžným způsobem extrahují a uchovávají v prostředí vhodného roztoku (např. v roztoku 10 mmol tris [= tris(hydroxymethyl)aminomethan] a 1 mmol EDTD [= kyselina ethylendiamin-tetraoctová], pH 8] při teplotě v rozmezí asi od -20°C do 4°C . Na druhé straně, pro expresi peptidů za průmyslových podmínek, se podle vynálezu dává přednost odolnějšímu kmenu, tj. kmenu *E. coli* K-12 λ -F $^-$ RV 308 str $^-$, gal 308 $^-$, označenému ATCC číslem 31008. Kmen RV 308 je nutričně divokým typem, roste dobře na minimální půdě a syntetizuje všechny nezbytné makromolekuly z běžných směsí anorganických, fosforečnanových a hořečnatých solí, stop kovů a glukosy. Po transformaci kultury RV 308 plasmidem odvozeným z kmene 294 se kultura pěstuje na agarových deskách v prostředí selektivním pro znak nesený plasmidem (jako je například resistance vůči antibiotikům) a kolonie transformantů se vyberou a kultivují v baňkách. Alikvotní díly posléze uvedené baňkové kultury v 10% roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo glycerolu (ve sterilních láhvkách) se rychle zmrazí v lázni z ethanolu a suchého ledu a uchovávají se při -80°C . Za účelem produkce zakódovaného heterologického polypeptidu se vzorky takto uložené kultury pěstují v prostředí obsahujícím tryptofan,

čímž se potlačí trp-promotor-operátor, pak se systém zbaví přídatného tryptofanu a tím dojde k vylučování peptidu.

Pro první stupeň kultivace se dá použít například LB živného prostředí (viz J. H. Miller v monografii „Experiments in Molecular Genetics“, str. 433, Cold Spring Harbor Laboratory 1972), které obsahuje na každý litr roztoku 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu a 10 g chloridu sodného. Inokulant se s výhodou kultivuje do optické hustoty (dále označované zkratkou „o. d.“) o hodnotě 10 nebo více (při 550 nm), výhodněji do o. d. 20 a nejvýhodněji do o. d. 30 nebo více, nicméně na o. d. menší než má stacionární fáze.

Za účelem dereprese a exprese polypeptidických produktů se inokulant poté kultivuje za podmínek, které zbavují buňky přídatného tryptofanu. Jedno z vhodných živných prostředí pro tento druh kultivace je půda M9 (viz J. H. Miller, shora uvedená monografie, str. 431), připravená následujícím způsobem (uvedeno množství substancí na jeden litr roztoku):

dihydrogenfosforečnan	
draselný	3 g
hydrogenfosforečnan sodný	6 g
chlorid sodný	0,5 g
chlorid amonný	1 g

Roztok se autoklávuje a pak se přidá:

10 ml 0,01 M roztoku bezvodého chloridu vápenatého

1 ml 1 M roztoku bezvodého síranu hořečnatého

10 ml 20% roztoku glukosy

1 µg/ml vitamínu B₁

40 µg/ml kaseinového aminokyselinového hydrolyzátu.

Posléze uvedený aminokyselinový dodatek živné půdy je hydrolyzát kaseinu prostý tryptofanu.

Aby se dosáhlo vylučování heterologického polypeptidu, zředí se inokulant vypěstovaný na živné půdě bohaté na tryptofan například větším objemem prostředí neobsahujícím další tryptofan (například 2 až 10násobné zředění) a pěstuje se až do dosažení žádané hladiny (výhodně krátce po stacionární fázi růstu); žádaný produkt se získá běžným způsobem lýzou, centrifugací a dalším čištěním. Ve fázi kultivace, při které se buňky zbavují tryptofanu, se buňky pěstují s výhodou do stupně o. d. vyšší než 10, ještě výhodněji do o. d. vyšší než 20 a nejvýhodněji do o. d. 30, nebo vyšší (měřeno při 550 nm) a pak se izoluje žádaný produkt.

Všechny rekombinace DNA popsané v následujících příkladech byly provedeny v soulase se směrnici Národních zdravotnických ústavů pro výzkum rekombinovaných DNA.

Příklad 1

Expresí bílkoviny fúzované s trp D polypeptidem

Výhodný způsob vylučování fúzovaných bílkovin obsahujících žádané polypeptidy a na ně navázanou část aminokyselinové sekvence trp D polypeptidu, kterou lze oddělit in vitro prostřednictvím aminokyseliny methioninu, specificky citlivé na štěpení bromokyanem, jest popsán ve vztahu k obr. 1 až 3.

A. Konstrukce plasmidu pBRHtrp

Plasmid pGM1 (1 na obr. 1) nese tryptofanový operón *E. coli* mající vynechanou oblast ΔLE1413 (viz G. F. Miozzari a spolupracovníci, časopis J. Bacteriology /1978/, 1457 až 1436) a proto vylučuje fúzovanou bílkovinu obsahující prvních 6 aminokyselin hlavní trp sekvence a přibližně poslední třetinu trp E polypeptidu (dále označovanou jako LE') a rovněž trp D polypeptid ve svém celku, vše pod kontrolou promotorového-operátorového systému. Plasmid (20 µg) se digeruje restriční enzymem PvuII, který štěpí plasmid na pět místech. Fragmenty 2 genu se poté kombinují s EcoRI články (obsahujícími vlastní komplementární oligonukleotid 3 o sekvenci pCATGAATTCATG), čímž se umožní zapojit EcoRI místo štěpení posléze uvedeného fragmentu a vytvořit plasmid obsahující oblast EcoR I (20). Na 20 µg DNA-fragmentů 2 získaných z pGM1 shora uvedeným způsobem se nechá působit 10 jednotek T₄ DNA-ligázy v přítomnosti 200 pmol syntetického 5'-fosforylovaného oligonukleotidu pCATGAATTCATG (3) a 20 µl T₄ DNA ligázového pufru (20 mmol tris o pH 7,6, 0,5 mmol ATP, 10 mmol bezvodého chloridu hořečnatého a 5 mmol dithiothreitolu) při teplotě 4 °C přes noc. Roztok se pak 10 minut zahřívá na 70 °C, aby se přerušilo spojování. Získané konjugáty se poté rozštěpí digescí s restričním enzymem EcoRI a fragmenty, obsahující nyní EcoRI konce, se izolují za použití elektroforézy na 5% polyakrylamidovém gelu (tento postup je v dalším popisu označován jako „PAGE-elektroforéza“). Tři největší fragmenty se z gelu izolují, po předchozím obarvení ethidiumbromidem a určení jejich polohy v ultrafialovém světle, vyříznutím příslušných částí gelové vrstvy obsahujících žádané produkty. Každý vyříznutý fragment gelové vrstvy se umístí spolu s 300 µl 0,1 × TBE pufru do dialyzační komory a podrobí se elektroforéze při 100 V po dobu 1 hodiny v 0,1 × TBE pufru (TBE pufr obsahuje 10,8 g tris-base, 5,5 g kyseliny borité, 0,09 gramu Na₂EDTA v 1 litru vody). Vodný roztok z dialyzační komory se spojí, extrahuje se fenolem a chloroformem, pak se upraví chloridem sodným na 0,2 M roztok a žádaný fragment DNA se získá po vysrážení etha-

nolem ve vodném roztoku. (Všechny isolace DNA fragmentů popsané dále byly prováděny pomocí PAGE elektroforézy a následující elektroeluce právě uvedeným způsobem). Získaný gen obsahující trp-promotor-operátor a EcoR I „lepivé“ konce (5) byl identifikován dále popsaným postupem, který spočívá v zavedení zmíněných fragmentů do plasmidu 6 citlivého na tetracyklin, který se po uvedeném včlenění promotoru-operátoru stane rezistentním vůči tetracyklinu.

B. Sestrojení plasmidu pBRHtrp vylučujícího rezistenci vůči tetracyklinu za kontroly trp promotoru-operátoru a identifikace a rozmnožení DNA fragmentu obsahujícího trp-promotor-operátor, který byl izolován shora popsaným způsobem (A).

Plasmid pBRH1 6 (viz R. I. Rodriguez a spolupracovníci v časopise *Nucleic Acids Research* 6, 3267 až 3287 /1978/) vylučuje rezistenci vůči ampicilinu a obsahuje gen pro rezistenci vůči tetracyklinu, který však, poněvadž není připojen na promotor, nevylučuje posléze zmíněnou rezistenci. Plasmid je proto citlivý vůči tetracyklinu. Zavedením promotorového-operátorového systému přítomného v EcoRI oblasti se plasmid může stát rezistentním vůči tetracyklinu.

Plasmid pBRH1 se digeruje restriktivním enzymem EcoRI, enzym se odstraní fenolovou extrakcí a následující extrakcí chloroformem a po vysrážení ethanolem se DNA získá ve vodném prostředí. Vzniklá molekula DNA 7 se pomocí T₄ DNA ligázy váže shora popsaným způsobem, v oddělených reakčních směsích, s každým ze tří jednotlivých DNA fragmentů, získaných postupem uvedeným výše v části A. Rekombinovaná DNA přítomná v reakční směsi se použije k transformaci příslušných bakterií *E. coli* K-12, kmene 294, popsaných K. Backmanem a spolupracovníky v časopise *Proc. Nat' 1. Acad. Sci. USA* 73, 4174 až 4198 /1976/ a označených ATCC číslem 31448, standardní pracovní technikou; bakterie se naočkují na misky s agarem s minimální LB půdou obsahující 20 µg/ml ampicilinu a 5 µg/ml tetracyklinu. Vyrostlé tetracyklin-rezistentní kolonie se vyberou, plasmidická DNA se izoluje a přítomnost žádaného fragmentu se potvrdí restriktivní enzymatickou analýzou. Získaný plasmid 8, označený pBRHtrp, vylučuje β-laktamázu, která mu uděluje rezistenci vůči ampicilinu, a obsahuje fragment DNA zahrnující trp-promotor-operátor a kódující první bílkovinu složenou z prvních šesti aminokyselin hlavní trp sekvence fúzovaných s přibližně poslední třetinou trp E polypeptidu (tato část polypeptidu je označena LE'), a druhou bílkovinu odpovídající přibližně první polovině trp D polypeptidu (tato část polypeptidu je označena D'), a třetí bílkovinu kódovanou pro tetracyklinovou rezistenci genu.

C. Začlenění genů pro různé konečné polypeptidické produkty a vylučování posléze uvedených produktů ve formě fúzovaných bílkovin složených z konečného polypeptidu a specificky odštěpitelného trp D polypeptidického prekursoru (obr. 2).

Z plasmidu pBRHtrp se získá fragment DNA obsahující trp promotor-operátor a kodóny pro LE' a D' polypeptidy, který se vloží do plasmidu obsahujícího strukturální geny pro tvorbu různých žádaných polypeptidů, jak je dále ukázáno na příkladu somatostatinu (viz obr. 2).

Plasmid pBRHtrp se digeruje restriktivním enzymem EcoRI a získaný fragment 5 se izoluje za použití PAGE elektroforézy a elektroeluce. Produkt 10, získaný EcoRI digescí plasmidu pSom 11 9 (viz K. Itakura a spolupracovníci v časopise *Science* 198, 1056 /1977/); britský patent 2 007 676 A), se kombinuje s fragmentem 5. Na směs se působí T₄ DNA ligázou, jak bylo popsáno výše, a získanou DNA se transformují shora uvedeným způsobem bakterie *E. coli* K-12, kmene 294. Selektce transformovaných bakterií se provede na agarových deskách obsahujících ampicilin. Získané, vůči ampicilinu rezistentní kolonie se hybridizují sloupcovou pracovní technikou (viz M. Gruenstein a spolupracovníci v časopise *Proc. Nat' 1. Acad. Sci. USA* 72, 3951 až 3965 /1975/), za použití vzorku fragmentu 5 obsahujícího trp-promotor-operátor, izolovaného z pBRHtrp, který byl radioaktivně značen fosforem P³². Proveďte se selektce kolonií, které jsou pozitivní při sloupcové hybridizaci, plasmidická DNA se izoluje a umístění vložených fragmentů se stanoví restriktivní analýzou za použití restriktivních enzymů BglII a BamHI při dvojité digesci. Bakterie *E. coli* 294 obsahující plasmid označený pSOM7 Δ2 11, který obsahuje trp-promotorový-operátorový fragment v žádané orientaci, se kultivují v živné půdě LB obsahující 10 µg/ml ampicilinu. Buňky se pěstují do dosažení hustoty o. d. 1 (při 550 nm), pak se odcentrifugují a suspenzují se znovu v desetinasobném zředění do živné půdy M9. Buňky se kultivují 2 až 3 hodiny, opět do optické hustoty 1, pak se lizují a celková buněčná bílkovina se analyzuje za použití elektroforézy na PAGE, obsahujícím 15 % SDS-močoviny (SDS = dodecylsulfát sodný) (viz J. V. Maizel a spolupracovníci v časopise *Meth. Viral* 5, 180 až 246 /1971/).

Na obr. 3 je znázorněna gelová analýza bílkovin, při které byla celková bílkovina získaná z různých kultur rozdělena na jednotlivé složky. Hustota jednotlivých pásů je měřítkem množství, ve kterém jsou jednotlivé bílkoviny přítomny. Na uvedeném obrázku představují dráhy 1 a 7 kontrolní vzorky zahrnující různé bílkoviny s předem stanovenou polohou, které slouží jako body pro srovnávání. Dráhy 2 a 3 znázorňují

dělení celulórní bílkoviny získané z kolonií *E. coli* 294 transformovaných plasmidem pSom7Δ2, kultivovaných jednak na živné půdě LB (dráha 2), jednak na půdě M9 (dráha 3). Dráhy 4 a 5 znázorňují dělení celulórní bílkoviny získané z analogických buněk *E. coli* 294 transformovaných plasmidem pTha7 Δ2, tj. plasmidem vylučujícím thimosin; uvedený plasmid se získá v podstatě stejnými postupy jak již bylo popsáno výše, počínaje plasmidem pTha1 (viz publikovaná přihláška evropského patentu č. 0035454). Dráha 4 znázorňuje dělení buněčné bílkoviny získané z bakterií *E. coli* 294/pTha7 Δ2 kultivovaných na LB půdě, a dráha 5 znázorňuje dělení buněčné bílkoviny získané ze stejného transformanta kultivovaného na půdě M9. Dráha 6 je další kontrola a znázorňuje rozdělení rodičovské bílkoviny z bakterií *E. coli* 294/pBR322, pěstovaných na LB půdě.

Ze srovnání s kontrolami vyplývá, že nejhořejší ze dvou největších párů v každé z drah 3 a 5 patří předpokládaným polohám bílkovin vylučovaných ve formě fúzaného proteinu skládajícího se z D'-polypeptidu a somatostatinu, popřípadě thymosinu (další hlavní pásy představují LE' polypeptid vznikající vynecháním útlumové oblasti). Obr. 3 potvrzuje, že exprese je v živné půdě bohaté na tryptofan potlačena, ale naopak uvolněna za podmínek s nedostatkem tryptofanu v půdě.

D. Štěpení bílkovin bromkyanem a radioimunanostanovení hormonálního produktu

V obou případech, jak u bílkoviny obsahující thymosin, tak u bílkoviny obsahující somatostatin, byla celková buněčná bílkovina rozštěpena bromkyanem, rozštěpený produkt izolován a po vysušení suspendován v pufru a analysován radioimunometodou; bylo potvrzeno, že získané produkty jsou imunologicky identické se samostativem, popřípadě thymosinem. Štěpení bromkyanem je popsáno D. V. Goeddelem a spolupracovníky v časopise *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 76, str. 106 až 110 (1979/).

Příklad 2

Konstrukce plasmidů pro přímé vylučování heterologických genů za kontroly trp-promotorového-operátorového systému

Pro strategii přímého vylučování je nezbytné sestavit plasmid obsahující jediné restriční místo vzdálené od všech kontrolních prvků trp operonu, do kterého mohou být začleněny heterologické geny místo hlavní trp sekvence a ve vhodné prostorové relaci k ribozómovému vazebnému místu pro hlavní trp polypeptid. Přístup k dosažení přímého vylučování heterologických peptidů jest v dalším popsán na příkladu vylučování lidského růstového hormonu.

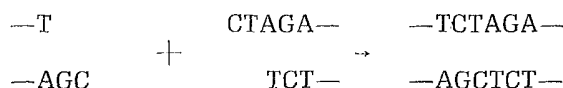
Plasmid pSom7 Δ2 (10 μg) se rozštěpí restričním enzymem EcoRI a DNA fragment 5, obsahující tryptofanové genetické prvky, se izoluje pomocí PAGE elektroforézy a elektroeluce. Získaný fragment (2 μg) se digeruje 10 minut při 37 °C dvěma jednotkami restriční endonukleázy Taq I tak, aby se v každé molekule rozštěpilo v průměru pouze jedno z přibližně pěti Taq I restričních míst. Získaná směs částečně rozštěpených fragmentů se rozdělí PAGE elektroforézou a fragment 12 (viz obr. 4), který obsahuje přibližně 300 párů basí, jeden EcoRI konec a jeden Taq I konec, se izoluje elektroelucí. Příslušné Taq I restriční místo jest umístěno mezi místy pro start transkripce a pro start translace a je o 5 nukleotidů vzdálené od ATG kodónu hlavního trp peptidu. DNA sekvence okolo tohoto místa je znázorněna na obr. 4. Uvedeným postupem lze izolovat fragment obsahující všechny kontrolní prvky trp operonu, tj. promotorový-operátorový systém, signál pro iniciaci transkripce a trn hlavní ribosomové vazebné místo.

Zbytek Taq I na konci 3' získaného fragmentu, sousedící se signálem pro start translace pro hlavní trp sekvenci, se poté převede do Xba I místa plasmidu pHS32 s vynechanou sekvencí EcoRI — Xba I, způsobem znázorněným na obr. 5. Tato operace se provede navázáním fragmentu 12, získaného shora uvedeným postupem, na plasmid obsahující jediné (to znamená jen jedno) EcoRI a jediné Xba I restriční místo. Pro tento účel lze použít v podstatě jakéhokoli plasmidu obsahujícího, v následujícím pořadí, replikón, selektivní znak, jako rezistenci vůči antibiotikům, a EcoRI, XbaI a BamHI restriční místa. Tak například lze XbaI restriční místo zavést mezi EcoRI a BamHI místa plasmidu pBR322 (viz F. Bolivar se spolupracovníky v časopise *Gene* 2, 95 až 119 (1977/)), například rozštěpením plasmidu v jeho jediné Hind III restričním místě pomocí enzymu Hind III, následující digestí vzniklých „lepivých“ konců specifickou jednovláknovou nukleázou a navázáním „tupých“ konců samoanelujícího dvouvláknového syntetického nukleotidu obsahujícího žádané rozpoznávací místo, jako sekvenci CCTCTAGAGG. Alternativně lze použít DNA fragmentů získaných z přirozených plasmidů, jak je tomu v dále popsaném případě, které obsahují jediné XbaI restriční místo mezi EcoRI a BamHI štěpnými zbytky. Tak například digestí virového genomu hepatitidy B enzymy EcoRI a BamHI se obvyklým způsobem získá produkt, který se začlení do EcoRI a BamHI restričních míst plasmidu pGH6 (viz D. V. Goeddel a spolupracovníci v časopise *Nature* 281, 544 (1979/)) za vzniku plasmidu pHS32. Získaný plasmid pHS32 se rozštěpí enzymem XbaI, směs se extrahuje fenolem, pak se extrahuje

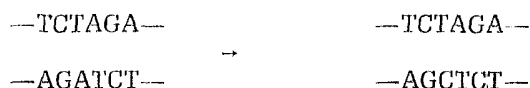
chloroformem a soli se vysráží ethanolém. Na rozštěpený plasmid se působí 1 μ l *E. coli* polymerázy I, Klenowovým fragmentem v prostředí 30 μ l polymerázového pufru (tj. 50 mmol fosforečnanu draselného o pH 7,4, 7 mmol chloridu hořečnatého bezv. a 1 mmol β -merkapt ethanolu) obsahujícího 0,1 mmol dTTP a 0,1 mmol dCTP, po dobu 30 minut při 0 °C a pak 2 hodin při 37°C. Při této reakci se doplní dva ze 4 nukleotidů, komplementárních k 5' vyčnívajícímu konci XbaI štěpícímu místu:



Inkorporují se dva nukleotidy, dC a dT, a vznikne konec se dvěma 5' vyčnívajícími nukleotidy. Tento lineární zbytek plasmidu pHS32 (isolovaný po extrakci fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolém ve vodném prostředí) se štěpí restriktčním enzymem EcoRI. Velký plasmidický fragment **13** se oddělí od menšího EcoRI — XbaI fragmentu PAGE elektroforézou a izoluje se elektroelucí. Tento DNA-fragment plasmidu pHS32 (isolovaný po extrakci fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolém ve vodném prostředí) se štěpí restriktčním enzymem EcoRI. Velký plasmidický fragment **13** se oddělí od menšího EcoRI — XbaI fragmentu PAGE elektroforézou a izoluje se elektroelucí. Tento DNA-fragment plasmidu pHS32 (0,2 μ g) se naváže, za podmínek podobných těm, které byly popsány výše, na shora uvedeným způsobem získaný EcoRI — TaqI fragment tryptofánového operonu **12** (~ 0,01 μ g), jak je znázorněna na obr. 5. Při tomto postupu se TaqI vyčnívající konec naváže na XbaI zbývající vyčnívající konec, i když jeho base nejsou kompletně spárovány podle Watsonova a Crickova principu:



Části takto získané reakční směsi liganů se transformují buňky bakterií *E. coli* 294 stejným způsobem, jak bylo popsáno výše v příkladu 1, pak se na kulturu působí teplem a přeočkuje se na agarové desky s LB půdou obsahující ampicilin. Selekcí se získá 24 kolonií rezistentních vůči ampicilinu, které se kultivují ve 3 ml LB půdy a plasmid se izoluje. Šest z těchto plasmidů má XbaI místo regenerované cestou bakteriemi *E. coli* katalysovaným přepárováním a replikací DNA:

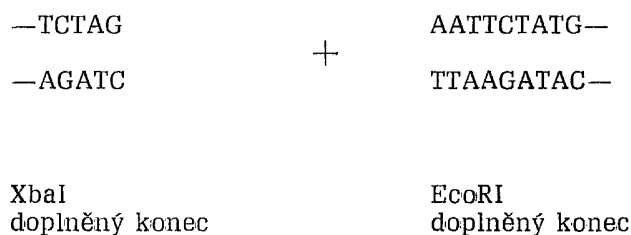


Bylo rovněž nalezeno, že se tyto plasmidy štěpí jak restriktčním enzymem EcoRI, tak HpaI, a poskytují očekávané štěpné fragmenty. Jednoho z těchto plasmidů **14**, označeného pTrp 14, lze použít pro vylučování heterologických polypeptidů, jak je popsáno dále.

Plasmid pHGH 107 (**18** na obr. 6; viz publikaci D. V. Goeddel a spolupracovníků v časopisu *Nature* 281, 544 /1979/) obsahuje gen pro lidský růstový hormon, složený z 23 aminokyselinových kodónů produkovaných ze syntetických DNA fragmentů, a ze 163 aminokyselinových kodónů získaných z komplementární DNA vytvořené cestou reverzní transkripce informační RNA pro lidský růstový hormon. Tento gen **21**, i když mu schází kodóny předcházející sekvence („pre“sekvence) lidského růstového hormonu, obsahuje ATG kodón pro iniciaci translace. Gen se izoluje z 10 μ g plasmidu pHGH 107 nejprve působením restriktčního enzymu EcoRI a poté připojením dTTP a dATP na získaný fragment působením Klenowovy *E. coli* polymerázy I, jak bylo již popsáno výše (viz obr. 6). Vzniklý plasmid se extrahuje fenolem, pak chloroformem a soli se vysráží ethanolém a poté se rozštěpí enzymem BamHI (viz obr. 6). Vzniklý fragment **21**, obsahující gen pro lidský růstový hormon („HGH“) se izoluje PAGE elektroforézou a následující elektroelucí. Výsledný DNA-fragment obsahuje rovněž prvních 350 nukleotidů strukturálního genu pro rezistenci vůči tetracyklinu, ale chybí mu tetracyklinový promotorový-operátorový systém, takže, když se v následujícím postupu začlení do plasmidu, který je schopný exprese, lze plasmidy obsahující tuto vložku určit podle obnovení tetracyklinové rezistence. Protože EcoRI zakončení fragmentu **21** je doplněno postupem za použití Klenowovy polymerázy I, má zmíněný fragment jeden „tupý“ a jeden „lepivý“ konec, což mu zajišťuje správnou orientaci, když je později včleněn do plasmidu schopného exprese; viz obr. 6.

V dalším se upraví plasmid pTrp 14 schopný exprese tak, aby mohl přijmout shora uvedeným způsobem připravený fragment **21** obsahující HGH-gen. Plasmid pTrp 14 se za tím účelem digeruje enzymem XbaI a získané „lepivé“ konce fragmentu doplní za použití postupu s Klenowovou polymerázou I a trifosfátů dATP, dTTP, dGTP a dCTP. Po extrakci reakční směsi fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolém se na získanou DNA **16** působí enzymem BamHI a vzniklý velký fragment plasmidu **17** se izoluje PAGE elektroforézou a elektroelucí. Uvedený fragment **17** odvozený od pTrp 14 má jeden „tupý“ a jeden „lepivý“ konec, které mu zajišťují správnou orientaci při rekombinaci s fragmentem **21** obsahujícím HGH gen a popsáným výše.

Fragment **21** obsahující HGH gen a fragment **17** pTrp14 Δ Xba-BamHI se zkombinují a navzájem naváží za podmínek podobných těm, které byly popsány výše. Doplněné XbaI



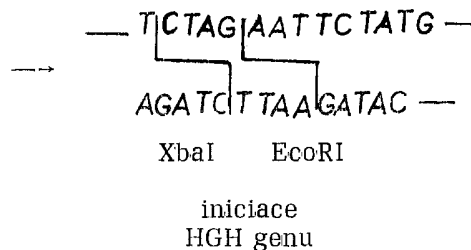
Touto konstrukcí se rovněž obnoví rezistence genu vůči tetracyklinu. Jelikož plasmid pHGH 107 vylučuje tetracyklinovou rezistenci z promotoru ležícího dále od HGH genu (lac promotor), umožňuje výsledná konstrukce plasmidu **22**, označená jako pHGH 207, vylučování genu pro tetracyklinovou rezistenci za kontroly tryptofánového promotoru-operátoru. Směsí ligandů, produktů rekombinace, se transformují bakterie *E. coli* 294 a provede se selekce rezistentních kolonií na agarových deskách s LB půdou obsahující 5 μ g/ml tetracyklinu.

Aby se potvrdilo přímé vylučování lidského růstového hormonu plasmidem pHGH 207, byla celková buněčná bílkovina, která byla získána z bakterií *E. coli* 294/pHGH 207, které byly kultivovány do optické hustoty 1 na LB půdě obsahující 10 μ g/ml ampicilinu, zředěny 1:10 do M9 půdy a kultivovány opět do o. d. 1, podrobena SDS-gelové elektroforéze jako ve shora uvedeném příkladu 1, a získaná data srovnána s analogickými výsledky elektroforézy lidského růstového hormonu, získaného již dříve expresí postupem podle jiných autorů (D. V. Goeddel se spolupracovníky, časopis *Nature* 281, 544/1979/).

Na obr. 7 je uvedena fotografie získané, obarvené gelové vrstvy po PAGE elektroforéze: Dráhy 1 a 7 obsahují standardy bílkovin o různých známých polohách na elektrogramu. Dráha 2 je kontrola, a znázorňuje rozdělení celkové buněčné bílkoviny z bakterií *E. coli*, kmene 294 pBR322; dráha 3 znázorňuje rozdělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 107, kultivovaných na LB půdě; dráha 4 ukazuje dělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 107 kultivovaných na M9 půdě; dráha 5 znázorňuje dělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 207 pěstovaných na LB půdě; a dráha 6 znázorňuje rozdělení bílkovin z bakterií *E. coli* 294/pHGH 207 kultivovaných na M9 půdě.

Hustý pás v dráze 6 je lidský růstový hormon, jak je zřejmé ze srovnání s podobnými pásy v drahách 2 až 4. Jak je podle vynálezu předpokládáno, produkují mikroorganismy *E. coli* 294/pHGH 207 při kultivaci na LB půdě bohaté na tryptofan méně lidského růstového hormonu z důvodu interakcí tryptofánového represoru s trp operátorem, a

a EcoRI konce se naváží spolu s tupými konci za obnovení obou XbaI a EcoRI štěpících míst:



při kultivaci na M9 půdě produkují podstatně více zmíněného HGH než bakterie *E. coli* 294/pHGH 107 vzhledem k indukci silnějšího tryptofánového promotorového-operátorového systému vůči lac-promotorovému-operátorovému systému v pHGH 107.

Příklad 3

Sestavení plasmidu s obecnou expresí pro přímé vylučování heterologických genů pod kontrolou tryptofánového promotoru-operátoru

Plasmid pHGH 207 sestavený v předcházejícím příkladu 2, se v dalším použije k získání fragmentu DNA obsahujícího kontrolní prvky tryptofánového operonu (s vynechanou útlumovou oblastí) a k sestavení plasmidického „vylučovacího vektoru“ vhodného pro přímou expresi genových vložek o různé struktuře.

Strategie pro sestavení plasmidu s obecnou expresí zahrnuje odstranění tryptofánové kontrolní oblasti z plasmidu pHGH 207 digescí restriktivním enzymem EcoRI a vsunutí získaného fragmentu do enzymem EcoRI digerovaného plasmidu pBRH1, používaného výše v příkladu 1. Plasmid pBRH1 je, jak již bylo výše uvedeno, plasmidem rezistentním vůči ampicilinu a obsahujícím gen pro tetracyklinovou rezistenci, ale je vůči tetracyklinu citlivý, neboť není přítomen vhodný promotorový-operátorový systém.

Výsledný plasmid pHKY 1, jehož zkonstruování je podrobněji popsáno níže a znázorněno na obr. 8, je rezistentní jak vůči ampicilinu, tak vůči tetracyklinu, obsahuje tryptofánový promotorový-operátorový systém, chybí mu tryptofánový útlumový článek a obsahuje jediné XbaI restriktivní místo vzdálené od tryptofánového promotoru-operátoru. Tryptofánový promotor-operátor a jediné XbaI místo jsou vázány mezi dvěma EcoRI štěpícími místy, takže uvedený fragment obsahující trp promotor-operátor-XbaI místo lze odstranit a vsunout do plasmidů obsahujících jiné strukturální geny.

Alternativně lze do tohoto plasmidu vsunout další heterologické strukturální geny, buď do XbaI štěpícího místa, nebo (po par-

ciální digesci enzymem EcoRI) do EcoRI restrikčního místa vzdálenějšího od tryptofánové kontrolní oblasti, v každém případě tak, aby přišel pod kontrolu tryptofánového promotorového-operátorového systému.

Plasmid pHGH 207 se digeruje restrikčním enzymem EcoRI a získaný trp promotorový fragment **23** obsahující EcoRI štěpící místo se izoluje za použití PAGE elektroforézy a následující elektroeluci.

Plasmid pBRH1 se digeruje restrikčním enzymem EcoRI a z konců rozštěpené molekuly se působením bakteriální alkalické fosfatázy („BAP“) (1 µg, v prostředí 50 mmol tris-pufu o pH 8 a 10 mmol bezvodého chloridu hořečnatého, po dobu 30 minut při 65 stupních C) odstraní fosfátové skupiny na vyčnívajících EcoRI koncích. Přbytek bakteriální alkalické fosfatázy se odstraní extrakcí fenolem a extrakcí chloroformem a soli se vysráží ethanolem. Získá se lineární DNA **7a**, které chybí fosfátové skupiny na vyčnívajících koncích a která přijímá a váže pouze vložky, jejichž komplementární „lepivé“ konce jsou fosforylovány, ale sama se neuzavírá do kruhového tvaru a dovoluje proto snadnější zkoušení plasmidů obsahujících různé vložené části.

Fragment **23**, získaný z plasmidu pHGH 207 a obsahující EcoRI, a lineární DNA získaná z plasmidu pBRH1 **7a** se zkombinují a vzájemně naváží v přítomnosti T₄ ligázy, způsobem popsaným výše. Části získané směsi se transformují bakterie *E. coli* kmene 294, analogicky jak je popsáno výše, a mikroorganismy se kultivují na agarových deskách s LB půdou obsahující 5 µg/ml tetracyklinu a touto selekcí se získá 12 kolonií rezistentních na tetracyklin. Z každé kolonie se izoluje plasmid a hodnotí se na přítomnost vsunutého fragmentu DNA restrikční endonukleázovou analýzou za použití štěpících enzymů EcoRI a XbaI. Jeden z takto získaných plasmidů obsahující žádanou vložku byl označen jako plasmid pHKY1.

Příklad 4

Sestrojení plasmidu obsahujícího tryptofánový operón, schopného exprese specificky štěpitelné fúzané bílkoviny obsahující 6 aminokyselin hlavního trp-peptidu, poslední třetinu trp E polypeptidu (označenou LE') a heterologický strukturální gen

Strategie pro sestrojení plasmidu vylučujícího fúzanou bílkovinu s LE' polypeptidem zahrnuje následující stupně:

a) Zajištění genového fragmentu obsahujícího kodóny pro vzdálenou oblast LE' polypeptidu a majícího Bgl II, popřípadě EcoRI záchytné konce na 5' a 3' koncích kodujícího vlákna;

e) Eliminace kodónů ze vzdálené oblasti LE' genového fragmentu a kodónu pro trp D

gen z plasmidu SOM 7 Δ 2, vsunutí fragmentu získaného ve stupni a) a obnovení LE' kodónové sekvence bezprostředně za sekvencí heterologického genu pro somatostatina.

Jak je znázorněno na obr. 9a, plasmid pSom 7 Δ 2 se digeruje enzymem Hind III a pak se digeruje lambda-exonukleázou (5' → 3' exonukleáza) za podmínek zvolených tak, aby štěpení probíhalo za Bgl II restrikčním místem s LE' kodující oblastí; 20 µg plasmidu pSom 7 Δ 2 digerovaného enzymem Hind III se rozpustí v pufru (20 mmol glycinového pufru o pH 9,3, 1 mmol bezvodého chloridu hořečnatého a 1 mmol β-merkaptoethanolu) a na směs se působí 60 minut při teplotě místnosti 5 jednotkami lambda-exonukleázy. Získaná reakční směs se extrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží ethanolem.

Aby se posléze vytvořil EcoRI zbytek na vzdálenějším konci LE' genového fragmentu, syntetizuje se zlepšenou fosfortriesterovou metodou (viz R. Crea se spolupracovníky, časopis Proc. Nat'l. Acad. Sci USA 75, 5765 /1979/) primér o složení



a hybridizuje se s jednovláknovým koncem LE' genového fragmentu, získaným digescí lambda-exonukleázou. Hybridizace se provádí níže popsaným způsobem.

20 µg fragmentu, získaného působením lambda-exonukleázy na produkt digesce plasmidu pSom 7 Δ 2 enzymem Hind III, se rozpustí ve 20 µl vody a k roztoku se přidá 60 µl roztoku obsahujícího asi 80 pmol shora popsaného 5'-fosforylovaného oligonukleotidu. Synthetický fragment se hybridizuje na 3' konec LE' kodující sekvence a zbývající jednovláknová část LE' fragmentu se doplní výše popsaným postupem s Klenowovou polymerázou I, za použití trifosfátů dATP, dTTP, dGTP a dCTP.

Reakční směs se zahřeje na 50 °C a pak se nechá zvolna vychladnout na 10 °C; poté se přidá Klenowova polymeráza. Po 15 minutách inkubace při teplotě místnosti a následujících 30 minutách inkubace při 37 °C se reakce zastaví přidáním 5 µl 0,25 M EDTA. Reakční směs se vyextrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží se ethanolem. Získaná DNA **28** se poté štěpí restrikčním enzymem Bgl II a fragmenty se rozdělí PAGE elektroforézou. Pomocí autoradiogramu gelové vrstvy se zjistí poloha ³²P-značeného fragmentu o očekávané délce řetězce přibližně 470 bp, a tento fragment se izoluje elektroelucí. Jak již bylo nastíněno výše, tento fragment LE' (d) má Bgl II konec a druhý konec „tupý“, koincidující se začátkem priméru.

Plasmid pTh α-1 popsaný výše v příkladu 1, části C, nese strukturální gen pro thymosin

alfa jedna, zakódovaný svým 5' koncem kódujícího vlákna do EcoRI místa a svým 3' koncem do BamHI místa. Jak je znázorněno na obr. 9b, obsahuje thymosinový gen rovněž Bgl II štěpící místo.

Plasmid pTh α 1 obsahuje též gen specifikujiící rezistenci vůči ampicilinu. Za účelem sestrojení plasmidu schopného přijmout shora uvedeným způsobem připravený fragment LE' (d) **29**, se pTh α 1 digeruje restriční enzymem EcoRI a pak se provede reakce s trifosfáty dTTP a dATP v přítomnosti Klenowovy polymerázy, aby se „otupily“ EcoRI zbytky.

Digescí získaného produktu enzymem Bgl II se získá lineární DNA fragment **33** obsahující gen pro ampicilinovou rezistenci a na opačném konci „lepivý“ Bgl II zbytek a na bližším konci „tupý“ zakončení. Vzniklý produkt se dá znovu uzavřít do kruhu reakcí s LE' (d) fragmentem **29** obsahujícím Bgl II záchytný konec a „tupý“ konec, v přítomnosti T₄ DNA-ligázy, a získá se plasmid pTrp 24 (**34** viz obr. 9b). Přitom se znovu vytvoří EcoRI štěpné místo v té poloze, kde dojde k vazbě s „tupým“ koncem.

Jak je znázorněno na obr. 10, postupná digesce plasmidu pTrp 24 restričními enzymy Bgl II a EcoRI a následující izolace produktu, za použití PAGE elektroforézy a elektroeluce, poskytne fragment mající kodóny pro LE' (d) polypeptid s Bgl II „lepivým“ koncem a EcoRI „lepivým“ koncem sousedícím s jeho 3' kódujícím zakončením. Získaný LE' (d) fragment **38** se dá začlenit do Bgl II místa plasmidu pSom 7 Δ 2 za vytvoření fúzané bílkoviny složené z LE' polypeptidu a somatostatinu, která je vylučována za kontroly tryptofanového promotoru-operátoru, jak je znázorněno na obr. 10.

Aby se shora popsané začlenění fragmentu **38** dalo provést, je třeba 1. částečně digerovat enzymem EcoRI plasmid pSom 7 Δ 2 za účelem jeho rozštěpení v EcoRI místě vzdálenějším od tryptofanového promotoru-operátoru, jak je znázorněno na obr. 10, a 2. vhodně zvolit sekvenci priméru (viz obrázek 9a), za účelem udržení správné translační stavby kodónu, a znovu sestavit plasmid v EcoRI štěpném místě.

Tak například se 16 μ g plasmidu pSom 7 Δ 2 zředí do 200 μ l pufru obsahujícího 20 mmol tris o pH 7,5, 5 mmol bezvodého chloridu hořečnatého, 0,02 mmol detergentu NP 40 a 100 mmol chloridu sodného, a působí na něj 0,5 jednotkami restričního enzymu EcoRI. Po 15 minutách působení při 37 stupních C se reakční směs vyextrahuje fenolem, extrahuje chloroformem a vysráží ethanolem a produkt se poté digeruje enzymem Bgl II. Vzniklý větší fragment **36** se izoluje za použití PAGE elektroforézy a elektroeluce.

Tento fragment obsahuje kodóny LE' (p) pro bližší konec LE' polypeptidu, tj. kodóny, které leží za Bgl II štěpícím místem. Fragment **36** se pak naváže na fragment **38** v

přítomnosti T₄ DNA ligázy za vzniku plasmidu pSom 7 Δ 2 Δ 4, kterým se pak transformují bakterie E. coli kmene 294, způsobem popsaným výše a účinně se tak produkuje, pod kontrolou tryptofanového promotoru-operátoru, fúzaná bílkovina skládající se z plně rekonstituovaného LE' polypeptidu a ze somatostatinu.

Fúzaná bílkovina, ze které může být somatostatin specificky odštěpen vzhledem k přítomnosti methioninu na 5' konci somatostatinové sekvence, se oddělí shora popsaným způsobem, za použití elektroforézy na sodiumdodecylsulfát-polyakrylamidovém gelu. Na obr. 11 je fúzaný protein jako nejzřetelnější pás v dráze 6 (bližší podrobnosti k obr. 11 jsou uvedeny v níže uvedeném příkladu 5).

Příklad 5

Sestrojení systému pro vylučování trp LE' polypeptidických fúzí, ve kterých je umístěna rezistence vůči tetracyklinu, za kontroly tryptofanového promotoru-operátoru

Strategie pro sestrojení vylučovacího prostředku schopného přijímat rozličné heterologické polypeptidické geny pro expresi odpovídajících bílkovin ve formě fúzí s trp LE' polypeptidem pod kontrolou tryptofanového operónu, zahrnuje zkonstruování plasmidu majícího následující charakteristiky:

1. Rezistenci vůči tetracyklinu, která se však může ztratit v případě, že se odstraní promotorový-operátorový systém kontrolující geny specifikujiící takovou rezistenci;

2. Odstranění promotorového-operátorového systému, který kontroluje rezistenci vůči tetracyklinu, a opětovné uzavření získaného lineárního fragmentu do kruhového tvaru navázáním zvoleného heterologického genu a tryptofanového promotorového-operátorového systému ve vhodné translační fázi vzhledem k němu, čímž se obnoví rezistence vůči tetracyklinu a v důsledku toho se umožní identifikace plasmidu obsahující vložený heterologický gen.

Ve stručnosti lze shrnout, že v souhlase s povahou uvažovaných vložených sekvencí je účelem sestrojit lineární část DNA mající Pst zbytek na svém 3' konci a Bgl II zbytek na svém 5' konci a vázající gen specificky schopný vytvářet rezistenci vůči tetracyklinu, když se uvede pod kontrolu promotorového-operátorového systému.

Tak například, jak je znázorněno na obrázku 12, se plasmid pBR322 digeruje enzymem Hind III a vyčnívající Hind III konce se poté digerují S1 nukleázou. Posléze uvedená digesce spočívá v tom, že se na 10 μ g plasmidu pBR322 rozštěpeného enzymem Hind III působí v prostředí 30 μ l pufru S1 (0,3 mol chloridu sodného, 1 mmol bezvodého chloridu zinečnatého, 25 mmol octanu

sodného, pH 4,5) 300 jednotkami nukleázy S1 po dobu 30 minut při 15 °C.

Reakce se zastaví přidáním 1 μ l 30 XS1 přerušovacího roztoku pro S1 nukleázu (0,8 mol tris-base a 50 mmol EDTA), směs se vyextrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží ethanolem. Získaný produkt **45** se digeruje výše popsaným způsobem štěpícím enzymem EcoRI a ze vzniklé směsi štěpů se velký fragment **46** izoluje PAGE elektroforézou a elektroelucí. Takto získaný fragment má jeden EcoRI „lepivý“ konec a druhý „tupý“ konec, jehož kódovací vlákno začíná nukleotidem thymidinem. Jak bude ukázáno v dalším popisu, může se S1 digerovaný Hind III zbytek začínající thymidinem připojit na Bgl II zbytek vzniklý působením Klenowovy polymerázy I a po navázání rekonstituovat Bgl II restriční místo.

Plasmid pSom 7 Δ 2, připravený způsobem popsaným výše v příkladu 1, se digeruje enzymem Bgl II a získaný fragment s Bgl II zachytnými konci se převede postupem s Klenowovou polymerázou I, za použití všech čtyř desoxynukleotidtrifosfátů, na dvouvláknový.

Vzniklý produkt se rozštěpí enzymem EcoRI a následující izolací menšího fragmentu **42** pomocí PAGE elektroforézy a elektroeluce se získá lineární část DNA obsahující tryptofánový promotor-operátor a kodóny nejbližší LE' sekvence za Bgl II štěpícím místem („LE' (p)“). Tento lineární fragment má jednak EcoRI konec a jednak „tupý“ konec vzniklý doplněním v Bgl II místě.

Bgl II místo se však rekonstruuje navázáním „tupého“ konce fragmentu **42** na „tupý“ konec fragmentu **46**. Oba posléze zmíněné fragmenty se uvedeným způsobem naváží v přítomnosti T4 DNA ligázy za vzniku znovu do kruhu uzavřeného plasmidu pHKY 10 (viz obr. 12), kterým se transformují buňky bakterií E. coli kmene 294.

Vypěstované, vůči tetracyklinu rezistentní buňky nesoucí rekombinovaný plasmid pHKY 10 se vyisolují, plasmidická DNA se vyextrahuje a poté se postupně digeruje restričními enzymy Bgl II a Pst, velký fragment získaný štěpením se izoluje PAGE elektroforézou a elektroelucí. Získá se lineární část DNA mající Pst a Bgl II zachytné konce.

Tento DNA fragment **49** obsahuje počáteční replikaci a je proto vhodný jako první komponenta pro konstrukci plasmidů, ve kterých oba geny, gen kódující bílkoviny fúzované s trp LE' polypeptidem a gen kódující rezistenci vůči tetracyklinu, jsou kontrolovány trp promotorem-operátorem.

Plasmid pSom 7 Δ 2 Δ 4, připravený způsobem popsaným v příkladu 4, lze zpracovat tak, aby poskytl druhou komponentu potřebnou pro sestavení systému schopného přijímat rozličné heterologické strukturální geny. Jak je uvedeno na obr. 13, podrobí se zmíněný plasmid částečné digesti restriční

ním enzymem EcoRI (viz příklad 4) a pak digesti enzymem Pst, a fragment **51** obsahující trp promotor-operátor se izoluje PAGE elektroforézou a následující elektroelucí.

Parciální digeste enzymem EcoRI se musí provádět proto, aby se získal fragment rozštěpený v sousedství 5' konce somatostatinného genu, ale nerozštěpený v EcoRI místě přítomném mezi genem pro ampicilinovou rezistenci a trp promotorem-operátorem. Ampicilinová rezistence ztracená štěpením enzymem Pst I v ap^R genu se dá znovu obnovit po vazbě s fragmentem **51**.

Jako první ukázka třetí komponenty potřebné pro konstrukci nového plasmidu je uveden strukturální gen pro thymosin alfa jedna. Připraví se tak, že se plasmid pTh α 1 podrobí digesti enzymem EcoRI a BamHI a získaný fragment **52** se čistí PAGE elektroforézou a elektroelucí.

Uvedené tři genové fragmenty **49**, **51** a **52** se navzájem naváží ve správné orientaci, jak je znázorněno na obr. 13, za vzniku plasmidu pTh α 7 Δ 1 Δ 4, který lze při kultivaci vybrat na základě jeho obnovené ampicilinové a tetracyklinové rezistence. Po transformaci bakterií E. coli kmene 294 a po kultivaci buněk za podmínek analogických těm, které byly popsány v příkladu 1, se získá plasmid vylučující fúzovanou bílkovinu s trp-polypeptidem LE', ze kterého lze specificky odštěpit thymosin alfa jedna působením bromkvanu.

Když se podobným způsobem naváží jiné strukturální heterologické geny mající EcoRI a BamHI zakončení s komponentami odvozenými z plasmidů pHKY 10 a pSom 7 Δ 2 Δ 4, získají se analogicky účinně fúzované bílkoviny s trp LE' polypeptidem, obsahující polypeptidy, pro které jsou příslušné heterologické geny kódovány.

Na obr. 11 jsou znázorněny výsledky dělení celkové buněčné bílkoviny získané z transformantů E. coli kmene 294, elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu, přičemž nejintenzivnější pásy v každém z uvedených případů představují produkty fúzovaných bílkovin vzniklé pod kontrolou tryptofánového promotorového-operátorového systému.

Na dráze 1, obr. 11 je pro kontrolu znázorněno rozdělení celkové buněčné bílkoviny získané z bakterií E. coli 294/pBR322. Dráha 2 znázorňuje rozdělení fúzovaného produktu obsahujícího somatostatin, získaného z plasmidu pSom 7 Δ 2 Δ 4 připraveného způsobem popsaným v příkladu 4. Dráha 3 znázorňuje rozdělení produktu vylučovaného z plasmidu pSom 7 Δ 1 Δ 4, obsahujícího somatostatin. Dráha 4 znázorňuje rozdělení produktu exprese z plasmidu pTh α 7 Δ 1 Δ 4, a dráha 5 znázorňuje rozdělení produktu vylučovaného z plasmidu získaného spojením shora popsaných fragmentů odvozených z plasmidů pHKY 10 a pSom 7 Δ 2 Δ 4 se strukturálním genem kódujícím lidský

proinsulin, zakončeným EcoRI a BamH I konci a připraveným částečně jedním z autorů tohoto vynálezu.

Dráhy 6 a 7 znázorňují, jako nejintenzivnější pás, bílkovinu fúzovanou s trp LE' polypeptidem, ze které lze specificky odštěpit B a A řetězce lidského inzulinu. Strukturální geny pro inzulin B a A se získají digescí plasmidů pIB1, popřípadě pIA11, restriktivními enzymy EcoRI a BamH I; konstrukci uvedených plasmidů popsali D. V. Goeddel se spolupracovníky v časopisu Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979). V dráze 8 je znázorněna poloha standardů.

Ačkoliv je způsob podle vynálezu popsán v jeho nejvýhodnějším provedení za použití bakterií E. coli, lze jako hostitelských buněk pro vylučování a jako zdrojů pro trp-operóny použít i jiných enterobakterií, ze kterých lze uvést například *Salmonella typhimurium* a *Serratia marcesans*. Způsob podle vynálezu není proto omezen na popsané výhodné provedení, ale jen na právní rozsah vyplývající z následujících bodů předmětu vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob štěpení dvojvláknové DNA v kterémkoliv daném bodě, vyznačující se tím, že

a) dvojvláknová DNA se převede v okolí obklopujícím daný bod na jednovláknovou DNA,

b) na jednovláknový úsek vytvořený ve stupni a) se hybridizuje komplementární délka jednovláknového DNA priméru, přičemž 5' konec priméru leží na opačné straně nukleotidu připojeného k zamýšlenému štěpícímu místu,

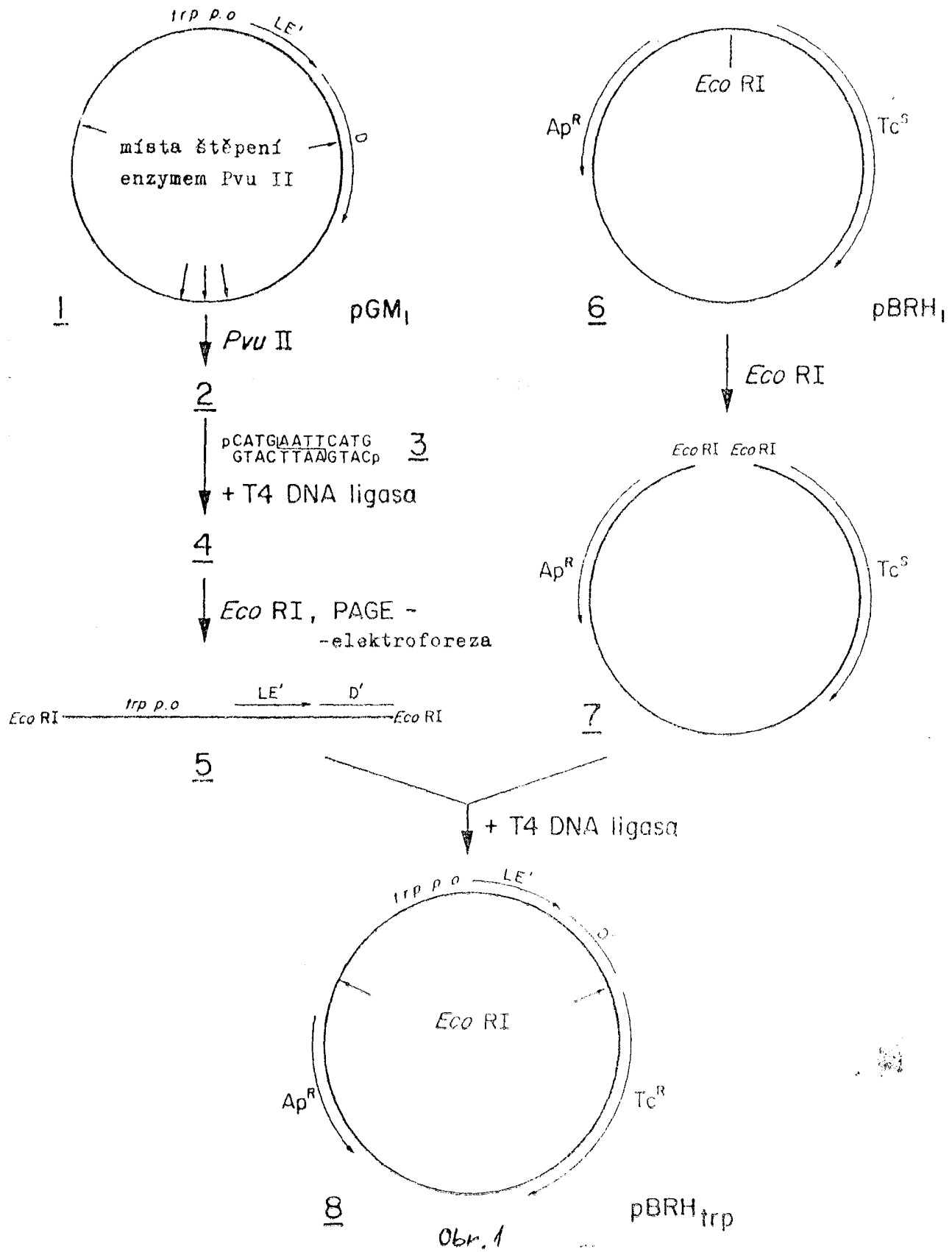
c) obnoví se ta část druhého vlákna eliminovaného ve stupni a), která leží v 3' směru od uvedeného priméru, reakcí s DNA

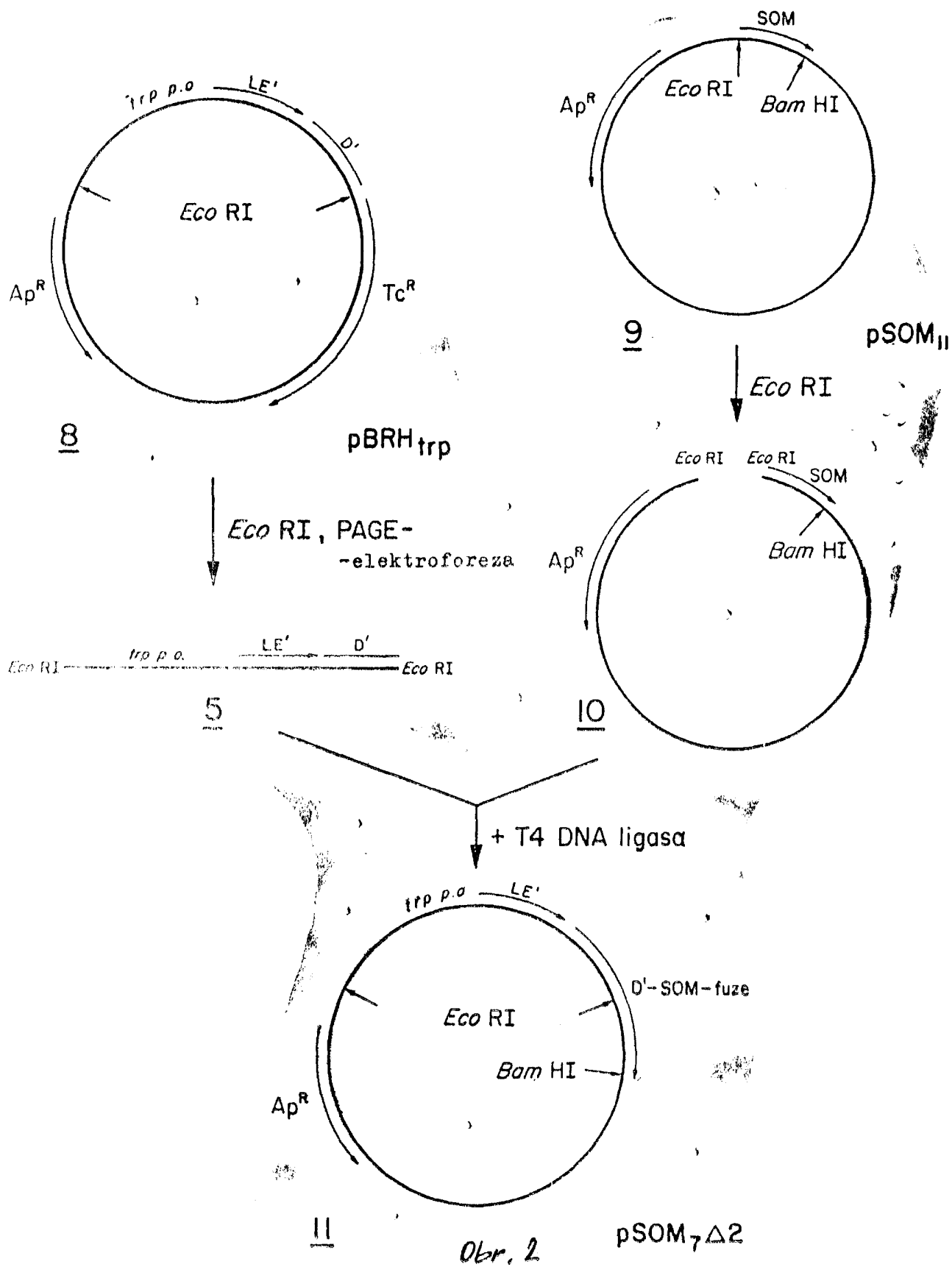
polymerázou v přítomnosti trifosfátů desoxynukleotidů obsahujících adenin, thymín, guanin a cytosin a

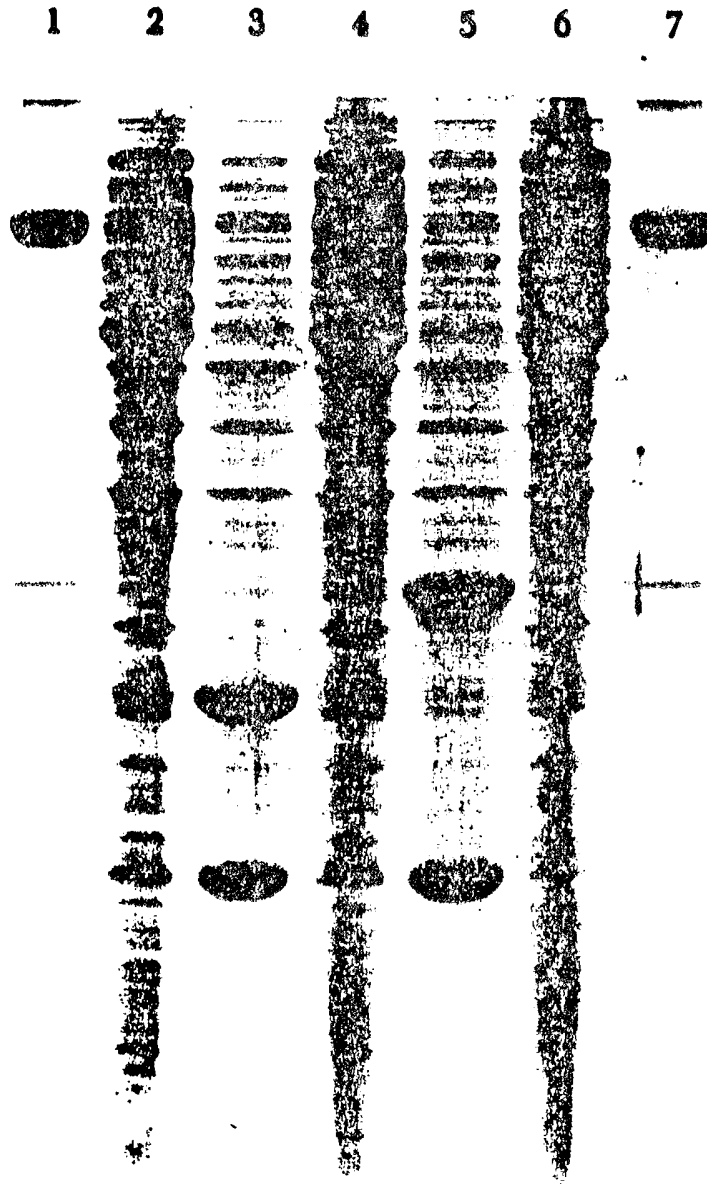
d) digeruje se zbývající jednovláknová délka DNA, která vyčnívá za zamýšleným štěpícím místem.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se stupně c) a d) provádějí současně reakcí s DNA polymerázou, která polymeruje ve směru 5' → 3', je exonukleolytická ve směru 3' → 5', ale není exonukleolytická ve směru 5' → 3'.

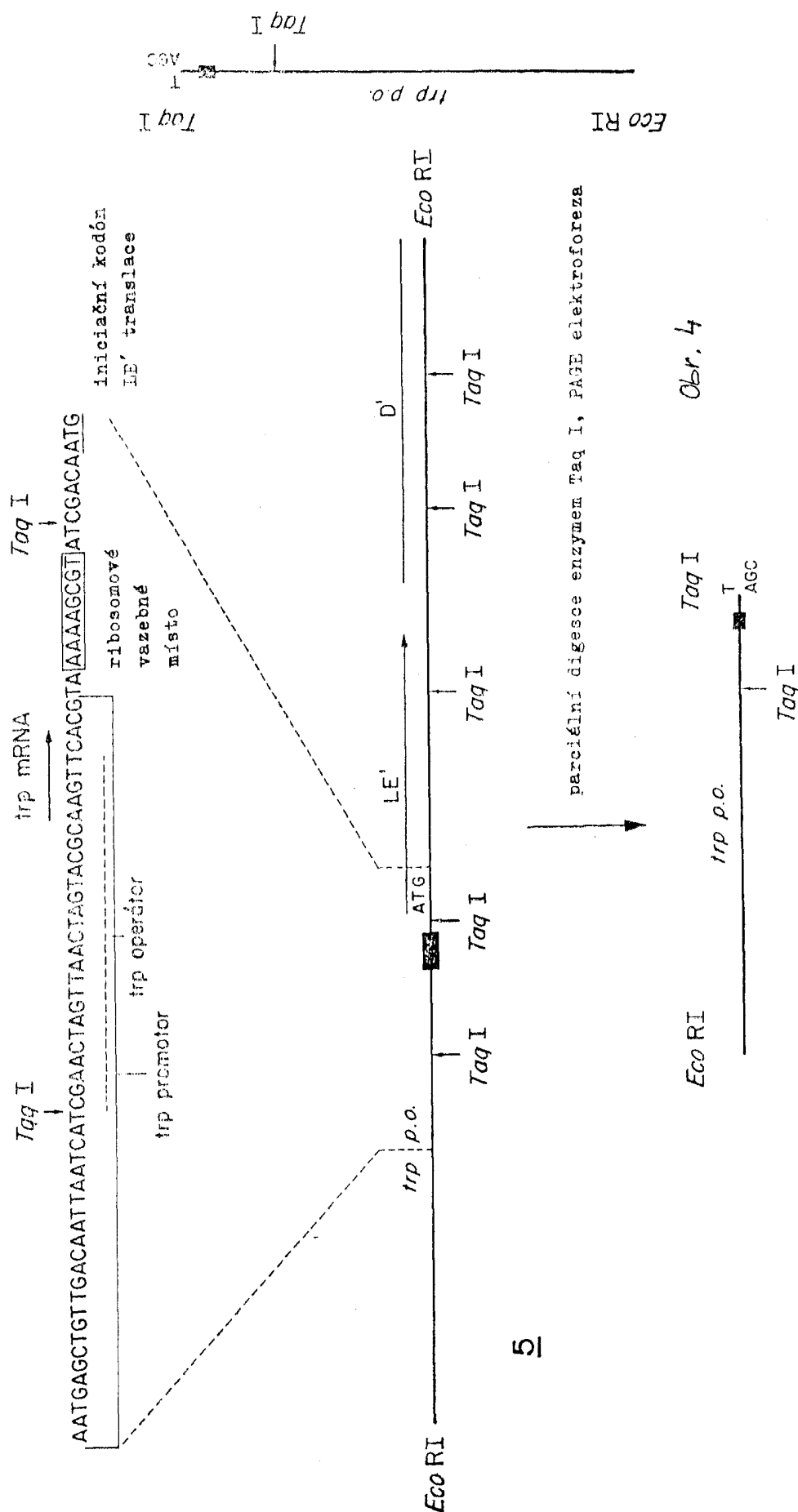
3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se stupně c) a d) provádějí současně reakcí s Klenowovou polymerázou I.







Obr.3



Eco RI
 AATTC
 G

trp p o.

Taq I
 T
 AGC

12

+ T4 DNA ligasa

Xba I
 CTAGC
 TCT

zřástečně
 doplněno

Eco RI

CTTAAG

Bam HI

Ap^R

PHS₃₂

(s vynechanou sekvencí
 Eco RI - Xba I)

13

Taq I - Xba I

Xba I

TCTAGC

AGCTCT

A

trp p o

GAATTC

Eco RI

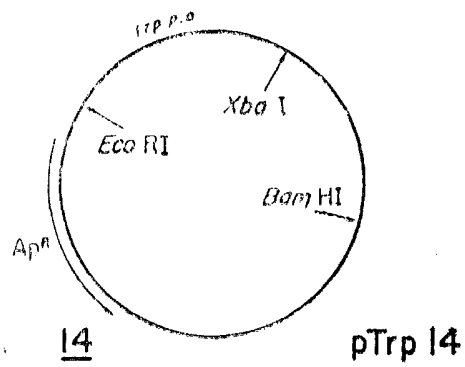
Bam HI

Ap^R

pTrp 14

14

obr. 5



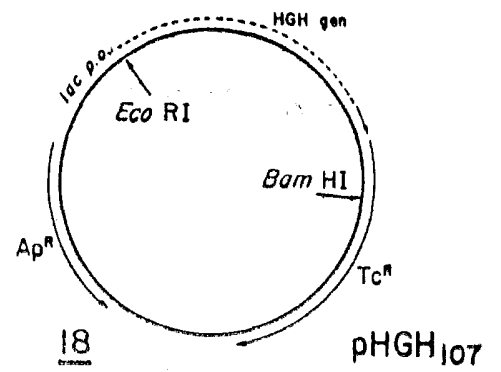
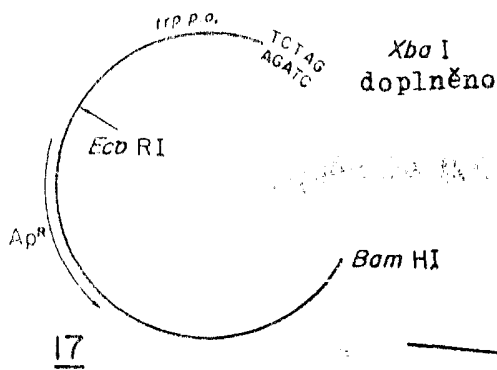
↓ Xba I

15

↓ Klenow, Pol.I
+ 4 dNTP's

16

↓ Bam HI, PAGE- elektroforeza



↓ Eco RI

19

↓ Klenow, Pol.I
dATP, dTTP

20

↓ Bam HI, PAGE-
- elektroforeza

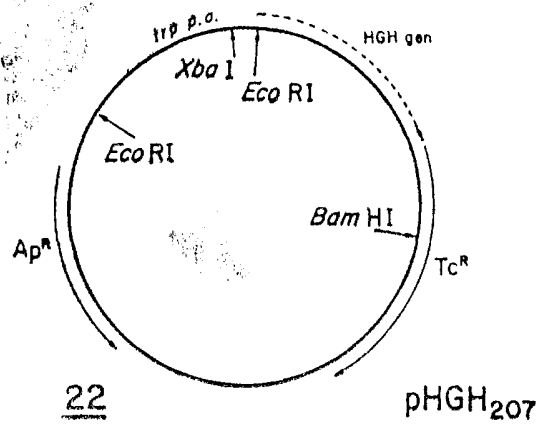
Eco RI
doplněno
AATTC
TTAAG

HGH gen

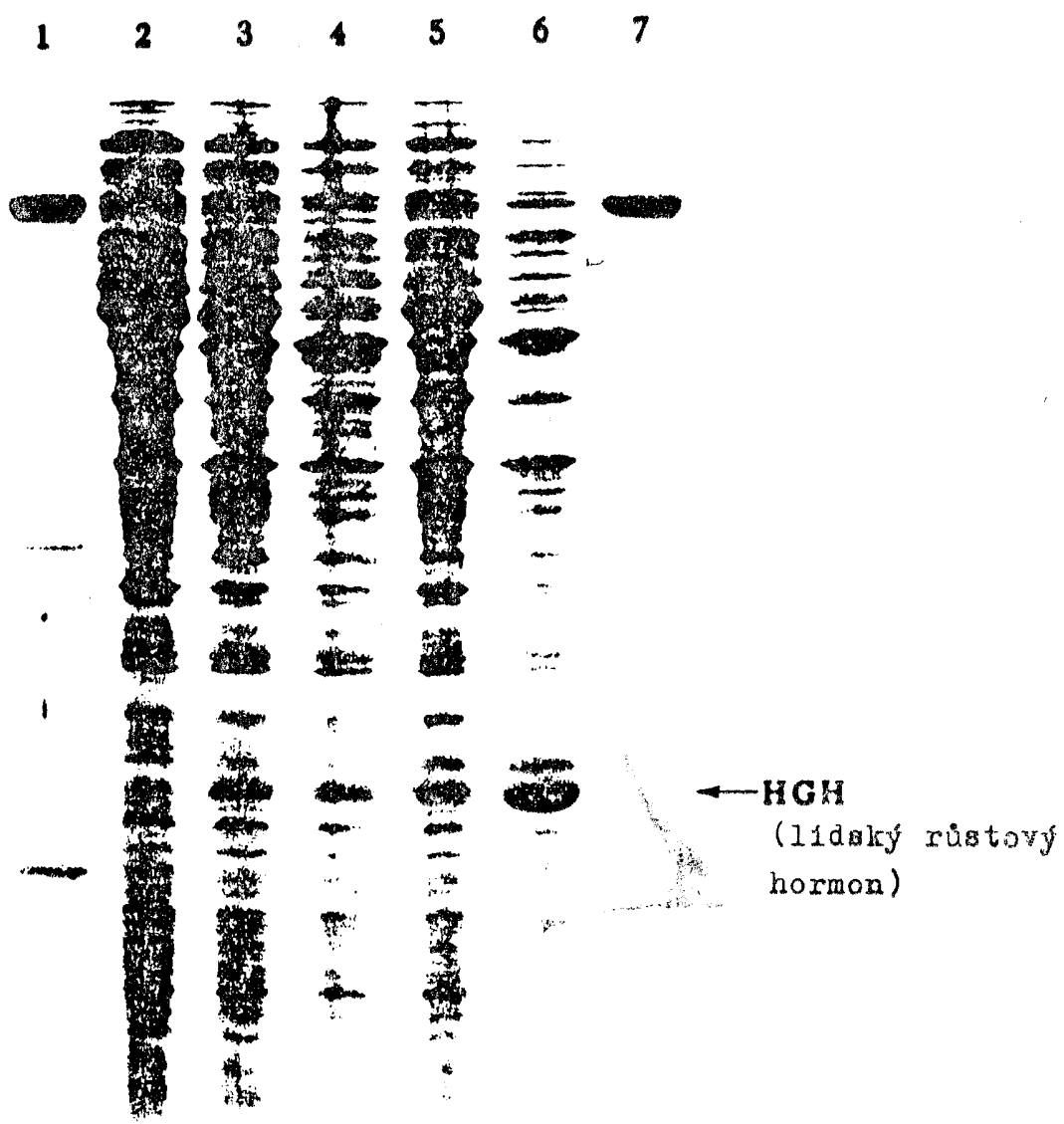
Bam HI

21

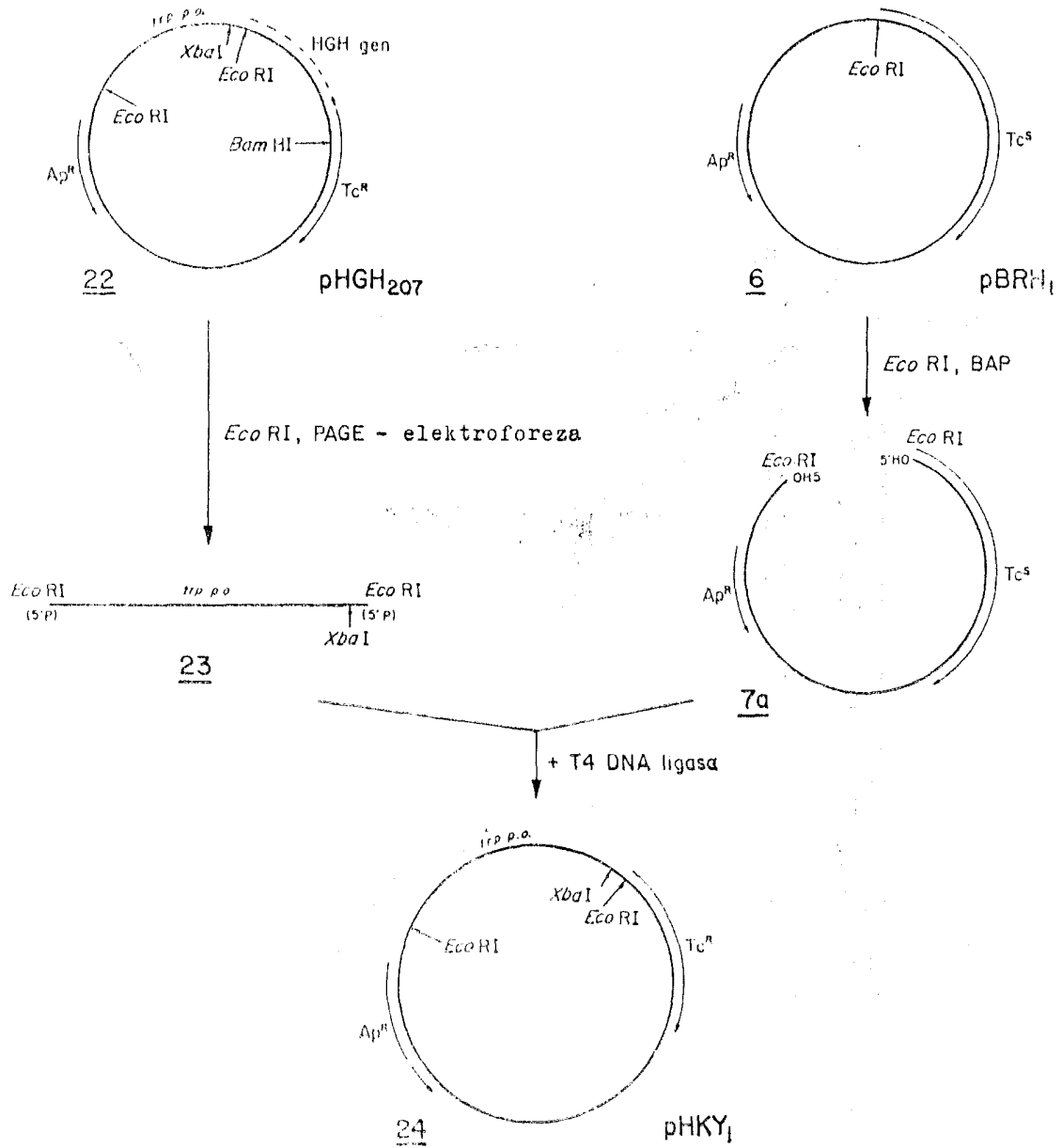
+ T4 DNA ligasa



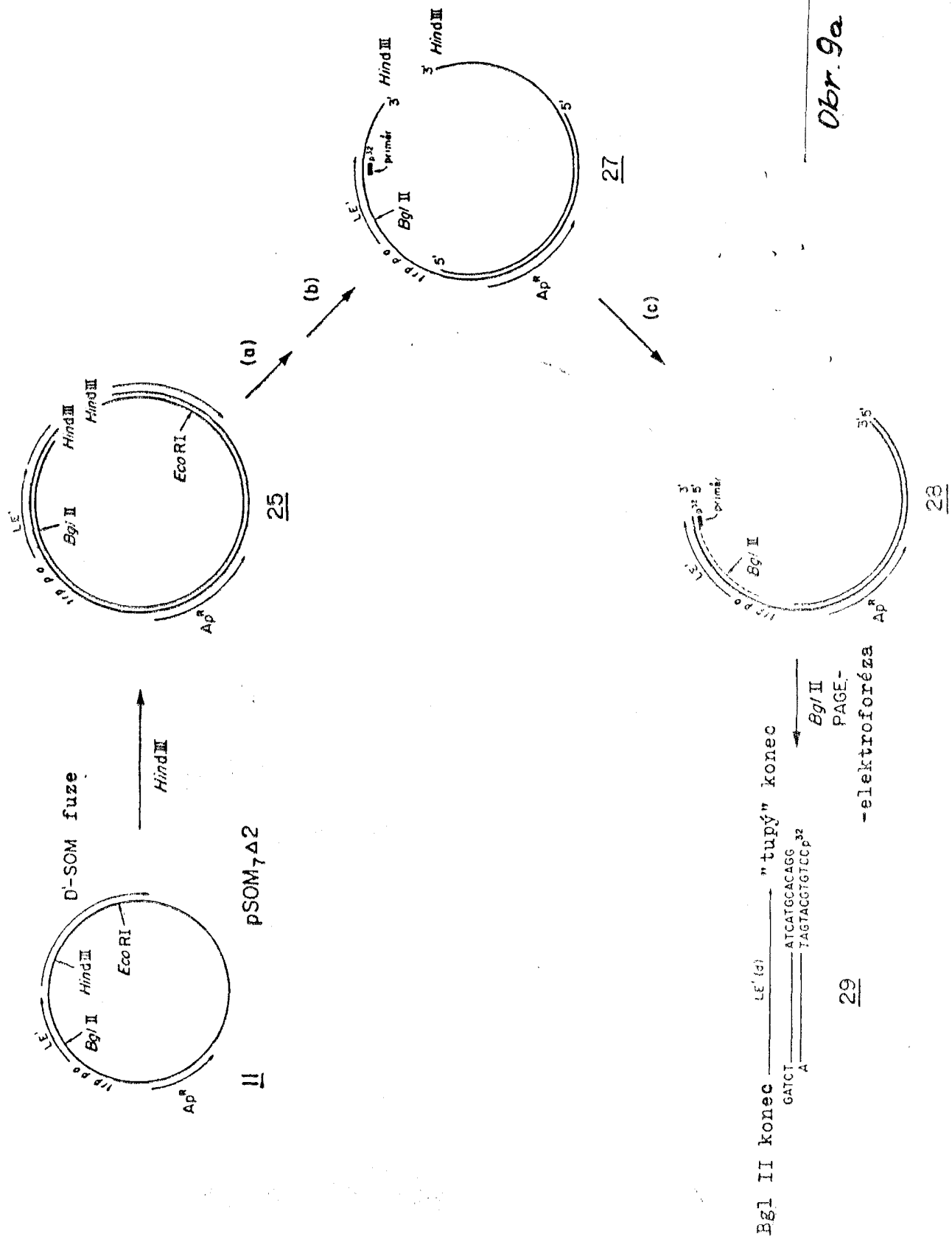
Obr. 6

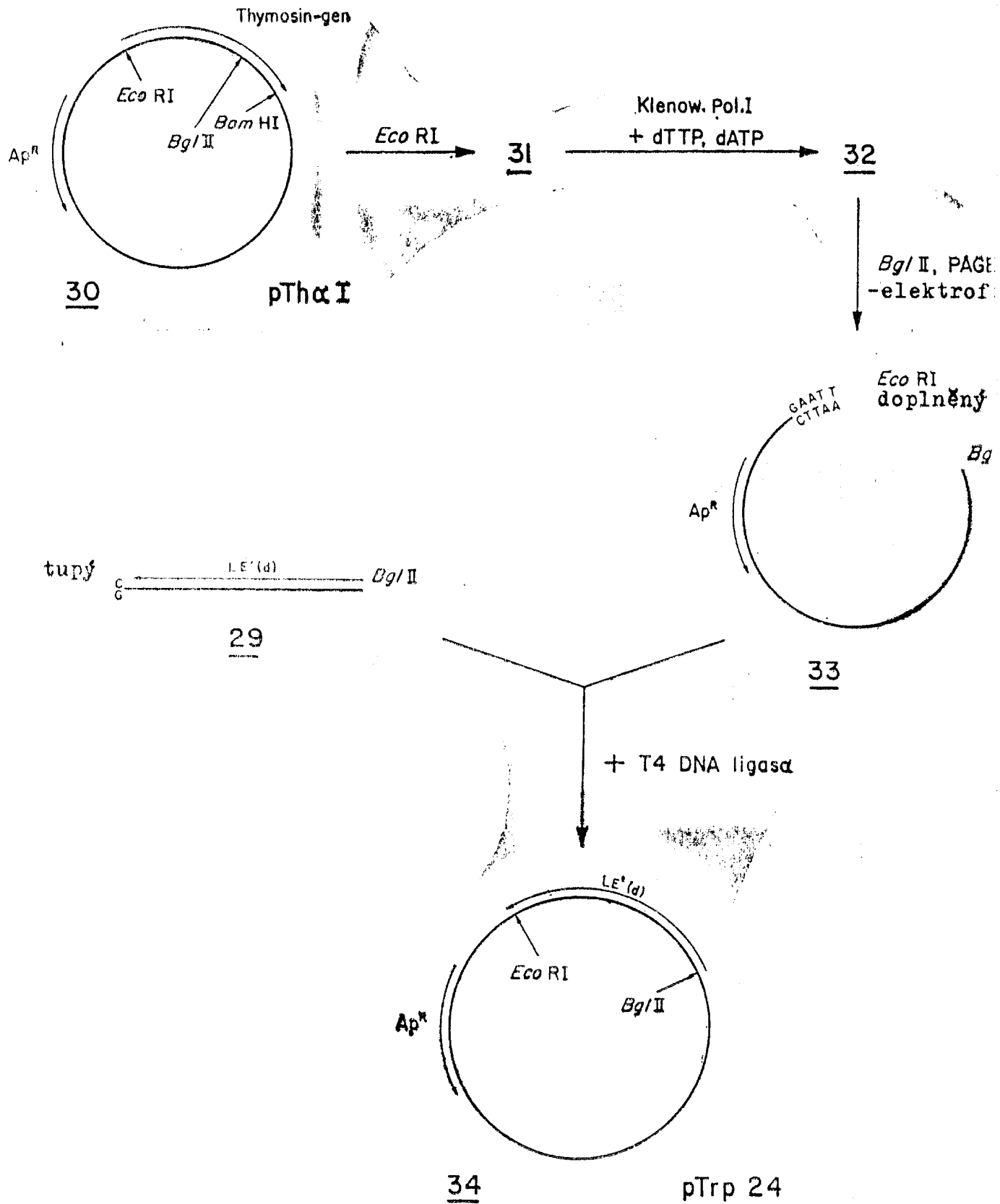


Obr. 7

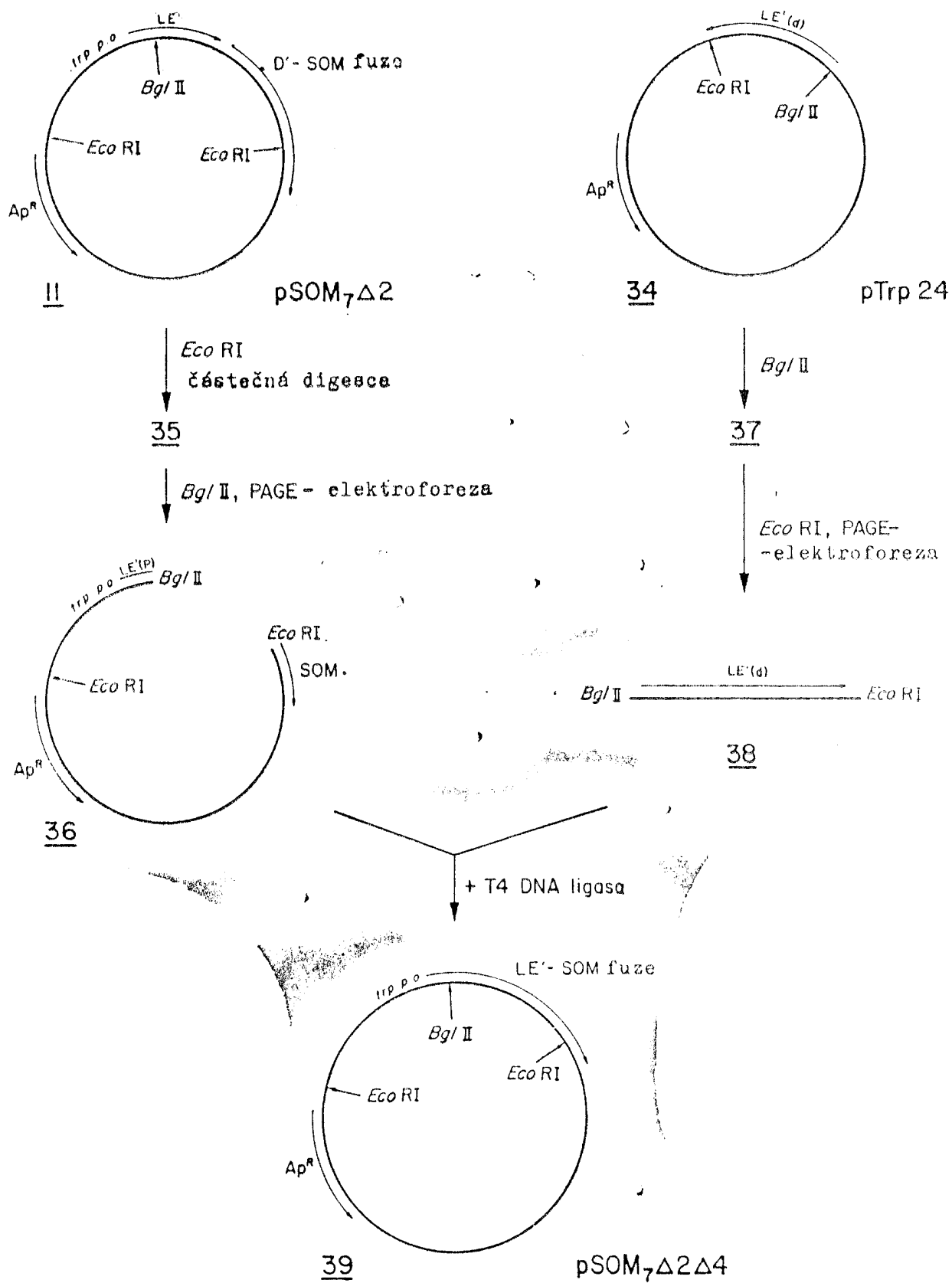


Obr.8



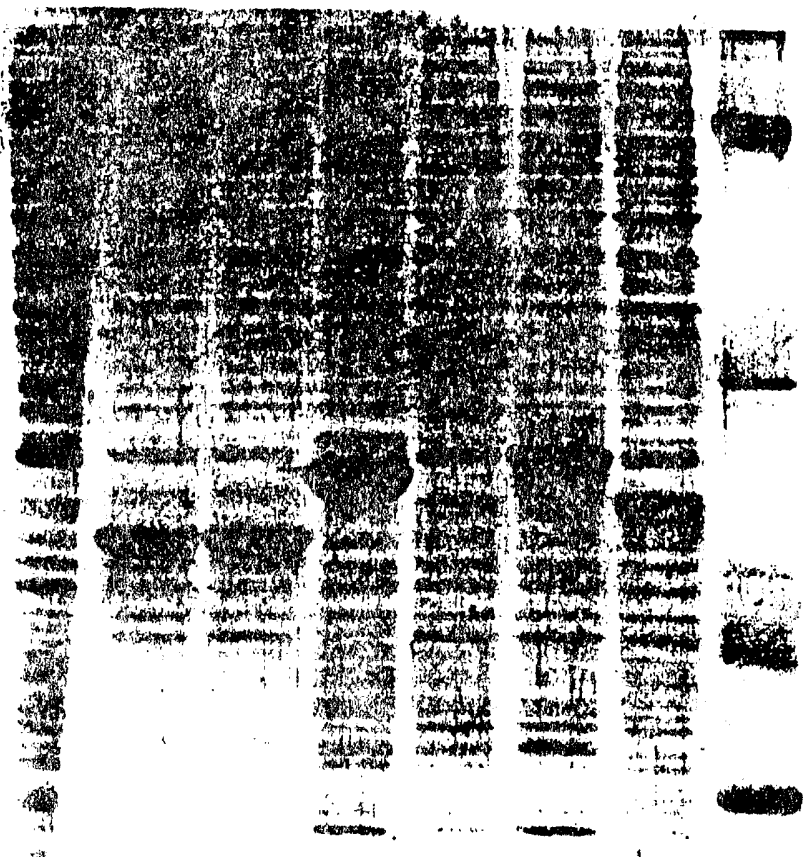


Obr. 96

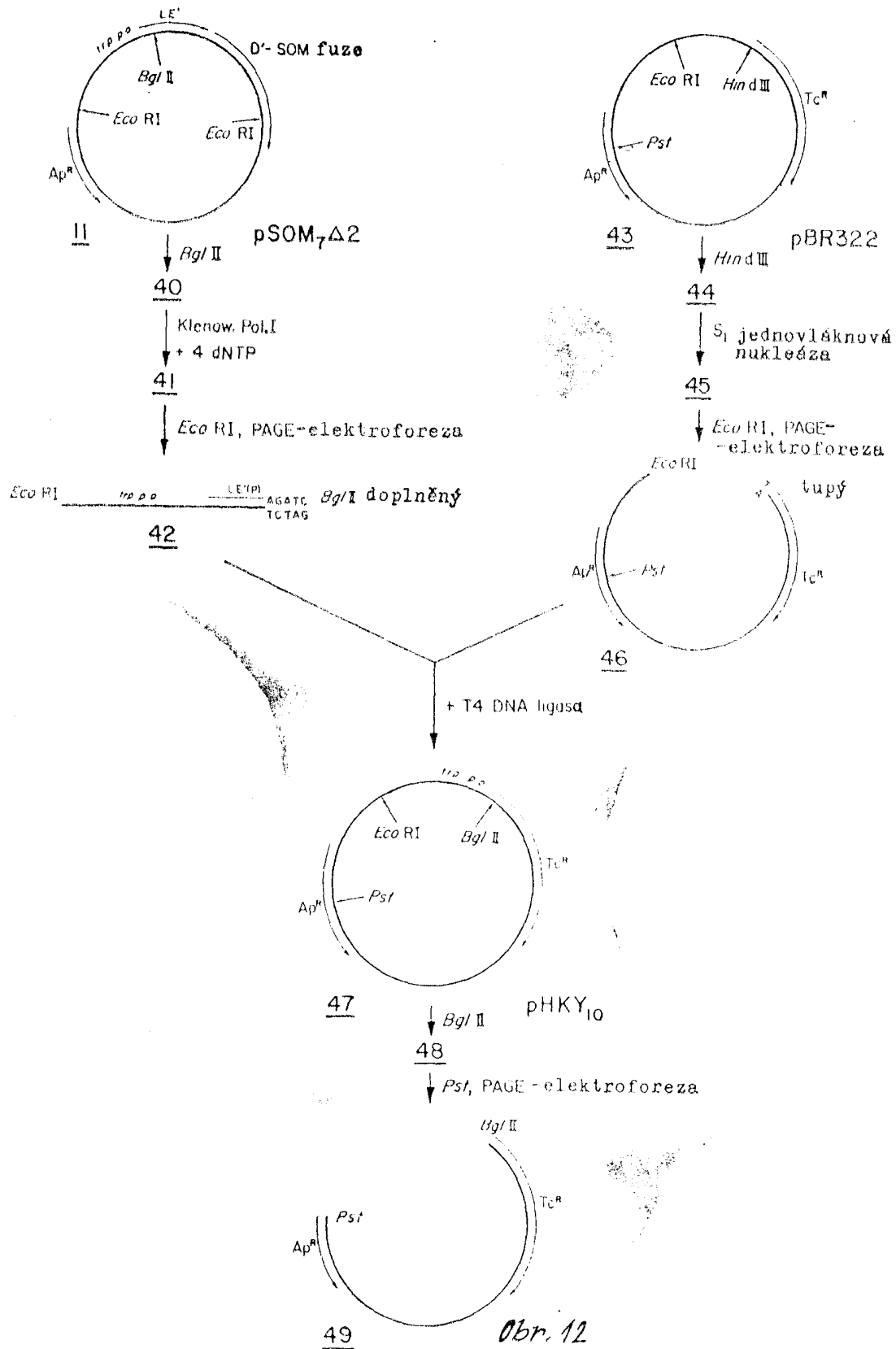


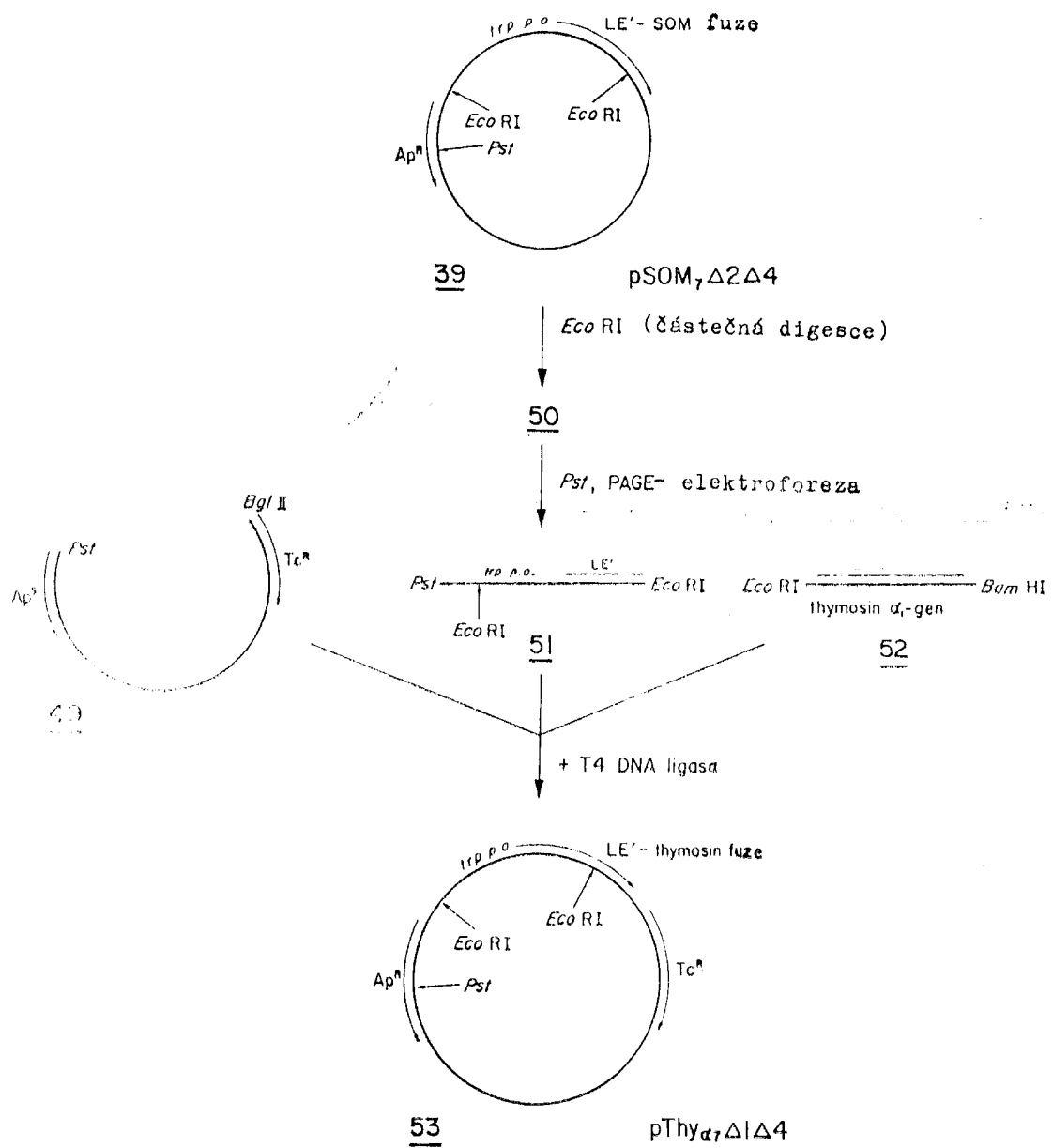
238646

1 2 3 4 5 6 7 8



Obr. 11





Obr. 13