



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

219257
(11) (B2)

[51] Int. Cl.³
C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 10 08 79

(21) [PV 5492-79]

(32) [31] [33] Právo přednosti od 11 08 78
[933.035] Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 25 06 82

(45) Vydáno 15 07 85

[72]

Autor vynálezu

RUTTER WILLIAM J., GOODMAN HOWARD M., BAXTER JOHN D., SAN FRANCISCO, CALIFORNIA (Sp. st. a.)

[73]

Majitel patentu

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

(54) Způsob výroby eukaryotické bílkoviny

1

2

Předmětem vynálezu je způsob syntézy eukaryotické bílkoviny při použití mikroorganismu, při němž se mikroorganismus transformuje vektorem pro přenos DNA, sestávajícím z bakteriálního genu s včleněným sledem nukleotidů, který je kódem pro eukaryotickou bílkovinu s následným přestováním mikroorganismu za podmínek, dovolujících expresi bakteriálního genu, vyznačující se tím, že včleněný sled sestává z cDNA, která je kódem alespoň pro část eukaryotické bílkoviny, vektor pro přenos DNA sestává z bakteriálního genu, obsahujícího alespoň oblast, řídící počátek transkripce a počátek translace a včleněný sled je uložen vzhledem k bakteriálnímu genu tak, že jakmile dojde k počátku transkripce a translace při pěstování transformovaného mikroorganismu za podmínek, dovolujících expresi bakteriálního genu, dochází také k transkripci a translaci uvedeného sledu, takže transformovaný mikroorganismus syntetizuje eukaryotickou bílkovinu nebo chimérní bílkovinu, která obsahuje eukaryotickou bílkovinu jako terminální sled aminokyselin na zakončení, na němž se nachází karboxylová skupina.

Pokrok v technologii rekombinantní DNA umožňuje izolovat specifické geny a jejich části z vyšších organismů, například z člověka a dalších savců a přenést tyto geny nebo jejich fragmenty do různých druhů mikroorganismů, například bakterií nebo kvasinek. Takto přenesený gen podléhá replikaci a propagaci při rozmnožování transformovaného mikroorganismu. V důsledku toho může transformovaný mikroorganismus nabýt schopnost vyrábět bílkovinu, pro kterou je gen nebo jeho fragment kódem, přičemž může jít o enzym, hormon, antigen, protilátku nebo o části těchto sloučenin. Mikroorganismus dále přenáší tuto získanou schopnost, takže ve skutečnosti vzniká při přenosu nový kmen s uvedenými vlastnostmi. Tyto postupy byly popsány například v publikaci Ullrich A. a další, *Science* **196**, 1313 (1977) a Seeburg, P. H. a další *Nature* **270**, 486 (1977). Základní skutečností, která podmiňuje použití této technologie pro praktické účely je to, že DNA všech živých organismů, od mikroorganismů až po člověka je chemicky příbuzná a skládá se ze stále stejných čtyř nukleotidů. Podstatné rozdíly spočívají ve sledu těchto nukleotidů v polymerní molekule DNA. Sled nukleotidů se užívá k charakteristice sledu aminokyselin v bílkovině, jíž je pak schopen mikroorganismus vyrábět. Přestože většina bílkovin různých organismů se od sebe liší, vztahy mezi kódem, to je sledem nukleotidů a sledem aminokyselin je v zásadě stejný pro všechny druhy organismů. Například též sled nukleotidů, který je kódem pro sled aminokyselin v růstovém hormonu v lidském podvěsku mozkovém je po přenosu do mikroorganismu kódem pro vznik téhož sledu aminokyselin.

Zkratky, užívané v průběhu přihlášky jsou uvedeny v následující tabulce 1:

TABULKA 1

DNA	kyselina desoxyribonukleová
RNA	kyselina ribonukleová
cDNA	komplementární DNA, enzymaticky syntetizovaná ze sledu mRNA
mRNA	RNA pro přenos do komplementárního řetězce (messenger)
dATP	desoxyadenosintrifosfát
dGTP	desoxyguanosintrifosfát
dCTP	desoxycytidintrifosfát
HCS	lidský choriový somatomotropin
TCA	kyselina trichloroctová
HGH	lidský růstový hormon
A	adenin
T	thymin
G	guanin
C	cytosin
U	uracil

Tris	2-amino-2-hydroxyethyl-1,3-propandiol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ATP	adenosintrifosfát
TTP	thymidintrifosfát
RGH	kryší růstový hormon

Kódové vztahy mezi sledem nukleotidů v DNA a sledem aminokyselin v bílkovině jsou obecně známy jako genetický kód a jsou uvedeny v tabulce 2.

TABULKA 2

Genetický kód

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

Klíč: Každý triplet písmen znamená trinukleotid mRNA se zakončením 5' na levém konci a se zakončením 3' na pravém konci. Písmena znamenají purinové nebo pyrimidinové báze, které tvoří sled nukleotidů.

A	adenin
G	guanin
C	cytosin
T	thymin
X	T nebo C v případě, že Y znamená A nebo G
X	C v případě, že Y znamená C nebo T
Y	A, G, C nebo T v případě, že X znamená C
Y	A nebo G v případě, že X znamená T
W	C nebo A v případě, že Z znamená A nebo G
W	C v případě, že Z znamená C nebo T
Z	A, G, C nebo T v případě, že W znamená C
Z	A nebo G v případě, že W znamená A

QR	TC v případě, že S znamená A, G, C nebo T
QR	AG v případě, že S znamená T nebo C
S	A, G, C nebo T v případě, že QR znamená TC
S	T nebo C v případě, že QR znamená AG
J	A nebo G
K	T nebo C
L	A, T, C nebo G
M	A, C nebo T

Důležitou vlastností kódu je skutečnost, že každá aminokyselina je charakterizována sledem trinukleotidů, nukleotidovým tripletem. Fosfodiesterové vazby, které spojují tripletety jsou chemicky nerozeznatelné od ostatních mezinukleotidových vazeb v DNA. Z toho vyplývá, že sled nukleotidů nemůže být odečten jako kód pro sled aminokyselin bez další informace, která se týká způsobu odečtení, to je bez další informace, která se týká seskupení tripletů, která je pro buňku genetickým poselstvím.

Předmětem vynálezu je způsob syntézy eukaryotické bílkoviny při použití mikroorganismu, při němž se mikroorganismus transformuje vektorem pro přenos DNA, sestávajícím z bakteriálního genu s včleněným sledem nukleotidů, který je kódem pro eukaryotickou bílkovinu s následným pěstováním mikroorganismu za podmínek, dovolujících expresi bakteriálního genu, vyznačující se tím, že včleněný sled sestává z cDNA, která je kódem alespoň pro část eukaryotické bílkoviny, vektor pro přenos DNA sestává z bakteriálního genu, obsahujícího alespoň oblast, řídící počátek transkripce a počátek translace a včleněný sled je uložen vzhledem k bakteriálnímu genu tak, že jakmile dojde k počátku transkripce a translace při pěstování transformovaného mikroorganismu za podmínek, dovolujících expresi bakteriálního genu, dochází také k transkripci a translaci uvedeného sledu, takže transformovaný mikroorganismus syntetizuje eukaryotickou bílkovinu nebo chimérickou bílkovinu, která obsahuje eukaryotické aminokyseliny na zakončení, na němž se nachází karboxylová skupina.

Řada technik pro vznik rekombinantní DNA užívá dvou skupin sloučenin, a to vektorů pro přenos a restrikčních enzymů. Vektorem pro přenos je molekula DNA, která mimo jiné obsahuje genetickou informaci, zajišťující vlastní replikaci této kyseliny po přenosu do kmene mikroorganismu. Příkladem vektorů pro přenos, běžně užívaných v bakteriální genetice jsou plazmidy a DNA některých bakteriofágů. Přestože plasmidy byly a jsou užívány jako vektory ve shora uvedeném smyslu, je zřejmé, že je možno užít i odlišné typy vektorů. Plazmid je termín, kterým se označuje autonomně se rep-

likující DNA, tak jak je možno ji nalézt v mikrobiální buňce, přičemž je odlišná od vlastního genomu hostitelské buňky. Plazmid proto není geneticky vázán na chromozom hostitelské buňky. Plazmidová DNA existuje jako kruhová struktura s dvojitým řetězcem o molekulové hmotnosti řádu několika miliónů daltonů, i když některé molekuly mají molekulární hmotnost větší než 10^8 daltonů. Tyto velké molekuly však tvoří obvykle pouze malý podíl celkového množství DNA v buňce. DNA, která je vektorem pro přenos je obvykle oddělitelná od hostitelské DNA vzhledem k velkému rozdílu mezi rozměrem molekul obou uvedených kyselin. Vektory nesou genetickou informaci, která jim umožňuje replikaci v rámci hostitelské buňky, a to v některých případech nezávisle na rychlosti dělení hostitelské buňky. Některé plazmidy mají tu vlastnost, že rychlost jejich replikace je možno řídit změnami růstových podmínek hostitelské buňky. Plazmidové DNA existuje jako uzavřený kruh. Vhodným způsobem je však možno tento kruh otevřít, vsunout fragment heterologní DNA a kruh znovu uzavřít, čímž vzniká zvětšená molekula, která obsahuje vsunutý segment DNA. V tomto smyslu může například DNA bakteriofága nést segment heterologní DNA, který je vsunut na místo některého z nepodstatných genů bakteriofága. V každém případě vektor slouží pro přenos vsunutého fragmentu heterologní DNA.

Přenos se uskutečňuje způsobem, který je znám jako transformace. V průběhu transformace dochází ke včlenění molekuly plazmidu do bakteriálních buněk, které byly smíseny s plazmidovou DNA. Zásadní průběh tohoto způsobu není zcela znám, působením některých pokusně zjištěných vlivů je však možno dosáhnout toho, aby co největší část užitých bakteriálních buněk přijala plazmidovou DNA a byla transformována. Jakmile je plazmid včleněn do buňky, dochází k jeho replikaci v rámci této buňky a replikovaný plazmid se dostává i do dceřiných buněk přidělení buňky. Jakákoli genetická informace, která je obsažena ve sledu nukleotidů plazmidové DNA může být v zásadě vyjádřena hostitelskou buňkou. Transformovaná hostitelská buňka se obvykle rozezná právě vlastnostmi, které získá včleněním plazmidu, například svou odolností proti působení některých antibiotik. Různé plazmidy jsou rozeznatelné podle svých různých schopností nebo podle kombinací schopností, které přenášejí na hostitelské buňky, které je obsahují. Jakýkoliv plazmid je možno získat ve velkém množství tak, že se pěstuje čistá kultura buněk s jeho obsahem a pak se izoluje z těchto buněk plazmidová DNA.

Restrikční endonukleázy jsou hydrolytické enzymy, které jsou schopny katalyzovat štěpení molekul DNA na určitých specifických místech. Místo působení restrikčního en-

donukleázy je možno stanovit podle existence specifického sledu nukleotidů. Tento sled se označuje jako místo působení restriční endonukleázy. Byly izolovány restriční endonukleázy z nejrůznějších zdrojů a tyto enzymy byly charakterizovány svými místy působení, to znamená sledem nukleotidů, v němž mohou rozštěpit molekulu. Některé restriční endonukleázy hydrolyzují fosfodiesterové vazby v obou řetězcích stejným způsobem, takže vznikají „slepé konce“. Jiné restriční endonukleázy katalyzují hydrolyzu vazeb, které jsou od sebe odděleny jen několika nukleotidy, takže dochází ke vzniku volných oblastí s jednoduchým řetězcem a s volnou vazbou na každém konci rozštěpené molekuly. Tyto jednoduché řetězce jsou komplementární a je jich tedy možno užít k opětovnému spojení hydrolyzované DNA. Protože každá DNA, kterou lze štěpit enzymem uvedeného typu, musí obsahovat totéž místo pro působení enzymu, vzniknou vždy tytéž komplementární konce, takže je možno spolu spojit heterologní sledy DNA po štěpení restriční endonukleázou s jiným sledem, který byl štěpen stejným způsobem. Tento postup je popsán například v publikaci Roberts R. J., Crit. Rev. Biochem, 4, 123 (1976). Místa pro štěpení restriční endonukleázou se vyskytují poměrně vzácně, obecná použitelnost restričních endonukleáz však byla podstatně rozšířena chemickou syntézou oligonukleotidů s dvojitým řetězcem a s obsahem sledu, který je místem pro působení těchto enzymů. Z tohoto důvodu je možno zásadně jakýkoli segment DNA vázat na jakýkoli jiný segment jednoduchým způsobem tak, že se na jeho konce naváže příslušný oligonukleotid s obsahem místa působení pro restriční endonukleázu produkt hydrolyzy po působení příslušné restriční endonukleázy má požadované komplementární konce. Tento postup je popsán například v publikaci Heyneker H. L. a další, Nature 263, 748 (1976) a Scheller R. H. a další, Science 196, 177 (1977). Důležitou vlastností rozdělení míst pro působení restriční endonukleázy je skutečnost, že tato místa jsou rozložena zcela náhodně ve sledu nukleotidů, zejména pokud jde o způsob odečítání genetické informace. Z toho vyplývá, že štěpení restriční endonukleázou může nastat mezi sousedními kodony nebo i uvnitř jediného kodonu.

K dispozici jsou také obecnější způsoby štěpení DNA, kterých je možno užít k modifikaci jednotlivých zakončení. Je například možno užít celou řadu nespecifických endonukleáz. Tyto enzymy pak štěpí DNA zcela náhodně na různých místech. Zakončení mohou být modifikována vazbou různých sledů dA + dT nebo dG + dC, čímž vzniknou místa pro působení enzymu bez nutnosti navázání specifických sledů.

Při použití rekombinantní techniky pro DNA bylo možno izolovat genetický kód pro krysí růstový hormon a tento kód dále čistit,

včlenit do plazmidu jako vektoru a převést do mikroorganismu *Escherichia coli*, čímž vznikl kmen *Escherichia coli* s genetickou schopností produkovat krysí růstový hormon.

Existence takového organismu má potenciálně velkou cenu pro farmaceutický průmysl. Růstový hormon savců je velmi úzce vázán svojí strukturou a zejména sledem aminokyselin. Přestože hormony jednoho druhu jsou účinné i u jiných druhů, není tomu tak ve všech případech. Například růstové hormony živočichů, odlišných od primátů, jsou neúčinné u lidí. Hormon je produkován podvěskem mozkovým ve velmi malém množství. Z tohoto důvodu mohly být až dosud dodávky přípravku s růstovým hormonem, zejména lidským růstovým hormonem velmi malé. Z tohoto důvodu je také nesmírně omezen výzkum tohoto hormonu. Možnost produkce růstového hormonu člověka i jiných živočichů by měla obrovský význam ve farmakologii, lékařství, veterinárním lékařství i chovu dobytka. Podáváním růstového hormonu je možno léčit některé odchylky lidského růstu a vývoje. Hormon je možno získat z mrtvých lidí a je možno jej žít v těžkých případech trpasličtí, způsobené nedostatečnou činností podvěsku mozkového. V současné době stojí toto léčení 5000 dolarů ročně jednoho nemocného. Bylo by zapotřebí léčit každý rok 1000 nových pacientů, přestože vzhledem k vysoké ceně je tato možnost omezena jen na nejtěžší případy. V případě, že by bylo možno hormon dodávat za nižší cenu, bylo by možno léčit přibližně 10 000 dalších nemocných, jejichž stav je méně vážný, kteří by však přesto léčbu potřebovali. Mimoto je zřejmé, že použití růstového hormonu by bylo velmi účelné i u jiných onemocnění, například při krvácení do trávicí soustavy, při hojení zlomenin a jiných úrazů a u metabolických onemocnění kostí. V současné době však není k dispozici dostatečné množství hormonu, aby bylo možno prokázat účinnost této léčby.

Růstové hormony zvířat mají rovněž své použití, zvláště v případech chovu na žír, kde je obvykle nutno dosáhnout rychlé zralosti a velké hmotnosti zvířete při současné co největší přeměně krmiva na bílkoviny. V případě, že se gen růstového hormonu přenesl do mikroorganismu, je možno vyvinout technologii, umožňující výrobu růstového hormonu v žádaném množství z žádaného zdroje při zlomku dnešní ceny. Bylo však zjištěno, že při přenosu genu pro růstový hormon do mikroorganismu nebylo možno na začátku dosáhnout výroby růstového hormonu ani prokázat sebemenší množství růstového hormonu v použitém mikroorganismu.

Při použití rekombinant DNA tak, jak to bylo popsáno v přihlášce č. 897 709 a ve shora uvedené publikaci Ullrich A., bylo

možno izolovat a čistit genetický kód pro krysi inzulin a včlenit tento kód do plazmidu a tento vektor pak přenést do mikroorganismu *Escherichia coli*, čímž vznikl kmen *Escherichia coli* s genetickou schopností vyrábět krysí inzulin. Existence takového organismu má velký potenciální význam pro farmaceutický průmysl a pro lékařství. Až dosud jsou nemocní cukrovkou závislí na dodávce inzulinu, který je extrahován ze slinivky břišní, získávané z jatek. Celkové požadavky na dodávku inzulinu patrně brzo překročí možnost této dodávky. Mimoto někteří nemocní jsou přecitlivělí na hovězí nebo vepřový inzulin, který se k tomuto účelu běžně užívá. Bylo by proto žádoucí vyrábět lidský inzulin v co největším množství. Při přenosu inzulinového genu do mikroorganismu je možno vyvinout fermentační technologii, která umožní výrobu inzulinu v požadovaném množství z požadovaného zdroje. Prozatím však v případě inzulinového genu po jeho přenosu do mikroorganismu nebyla pozorována exprese tohoto genu.

Termín „exprese“ je užíván k vyjádření skutečnosti, že organismus velmi zřídka využívá všech genetických schopností v jakémkoli daném čase. I v poměrně jednoduchém organismu, například v bakterii, nedochází k syntéze celé řady bílkovin, které by buňka byla schopna produkovat, může však k jejich syntéze dojít za vhodných zevních podmínek. V případě, že se bílkovina, pro níž je kódem daný gen skutečně produkuje, nazývá se tato skutečnost expresí genu. V případě, že se bílkovina neprodukuje, k expresi genu nedochází. Obvykle je možno expresi genů v *Escherichia coli* řídit tak, jak bude dále obecně uvedeno, například tak, že bílkoviny, jejichž funkce není v daném prostředí výhodná, se neprodukují a metabolická energie se uchovává. Je možno uvést několik hypotéz na vysvětlení počátečního neúspěchu při expresi eukariotického genu v *Escherichia coli*. Bylo zjištěno mnoho rozdílů mezi expresí prokariotického genu a eukariotického genu i kontrolních genů. Objev včleněných sledů, které přerušují sledy, které jsou kódem pro některou z bílkovin u mnoha eukariotických genů, dal vznik domněnce, že ještě další strukturní rozdíly mohou nepříznivě ovlivnit schopnost prokariotických genů k expresi eukariotické DNA. Tyto skutečnosti byly podrobněji uvedeny například v publikacích Tilghman S. M. a další *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 4406 (1977), a Jeffreys A. J. a Flavell, R. A. *Cell* **12**, 1097 (1977). Je možné, že eukariotická DNA obsahuje sled nukleotidů, který se chybně interpretuje při bakteriální transkripci nebo při použití translačních enzymů. Přestože univerzálnost genetického kódu je uznávanou skutečností, není dostatečně vysvětleno pozorování, že některé kodony jsou v eukariotické DNA zřejmě preferovány. Je dobře známo, že ří-

dicí prvky, které regulují dobu a množství exprese u genů živých buněk, jsou velmi odlišné od prvků buněk vyšších eukariotů, například krysy nebo člověka, než je tomu u prokariotů, například u *Escherichia coli*.

Způsob, jímž se řídí exprese genu u *Escherichia coli* je již dobře znám v důsledku intenzivních výzkumů, které byly prováděny v průběhu posledních 20 let. Tyto pokusy byly popsány například v publikacích Hayes W., *The Genetics of Bacteria And Their Viruses*, 2. vydání, John Wiley a Sons, Inc., New York (1968) a Watson J. D., *The Molecular Biology of the Gene*, 3. vydání, Benjamin, Menlo Park, California (1976). Tyto studie prokázaly, že některé geny, obvykle ty, které jsou kódem pro bílkoviny s příbuznými funkcemi v buňce, jsou obvykle v kontinuálním sledu. Tento sled se nazývá operon. Všechny geny v operonu se transkribují v tomtéž směru, přičemž se začíná od kodonu, který je kódem pro N-terminální aminokyselinu první bílkoviny ve sledu a pak se pokračuje až do C-terminálního zakončení poslední bílkoviny v operonu. Na začátku operonu v blízkosti kodonu pro N-terminální aminokyselinu existuje oblast DNA, která se nazývá řídicí oblast a která obsahuje celou řadu řídicích prvků včetně operátoru, promotoru a sledů pro ribosomální místa vazby. Funkce těchto míst spočívá v tom, že řídí expresi genů, jejichž exprese odpovídá okamžitým potřebám organismu. Například geny, které jsou kódem pro enzymy, využitelné výlučně ke štěpení laktózy, jsou řízeny tak, že nedochází k jejich expresi dříve, než se v živném prostředí objeví laktóza nebo některý z jejich analogů. Kontrolní oblasti, které jsou nutné zapotřebí k expresi, jsou řídicí oblasti pro počátek transkripce a pro počátek translace. Exprese prvního genu ve sledu závisí na počátku transkripce a translace v poloze, která je kódem pro N-terminální aminokyselinu první bílkoviny operonu. Pak dochází k expresi každého genu po řadě tak dlouho, až dojde k terminačnímu signálu nebo až je zařazen do řídicí oblasti jiný operon, který řídí odpověď na jiné seskupení podmínek zevního prostředí. Přestože od tohoto schématu může dojít k celé řadě odchylek, je důležitou skutečností, že gen musí být přesně uložen vzhledem k řídicí oblasti, zejména pokud jde o počátek transkripce a počátek translace, aby mohlo dojít k jeho expresi v prokariotickém organismu jako je *Escherichia coli*.

Bylo prokázáno, že je možno včlenit do operonu geny, které nejsou běžnou částí tohoto operonu. Klasický průkaz této možnosti byl podán v publikaci Jacob F. a další, *J. Mol. Biol.* **13**, 704 (1965). Tato publikace popisuje postup, při němž byly geny, které byly kódy pro enzymy biosyntézy purinů přeneseny do oblasti, řízené operonem pro laktózu. Došlo k úkazu, kdy exprese genu

pro biosyntézu uvedeného enzymu byla potlačena v nepřítomnosti laktózy nebo analogu laktózy a nebylo možno ji vyvolat podmínkami, které jinak běžně vyvolaly expresi.

Kromě operátoru, který řídí iniciaci transkripce genů, existují ještě kodony, jejichž funkcí je zastavit další syntézu a které tedy určují C-terminální zakončení dané bílkoviny. Tyto kodony byly uvedeny v tabulce 2 a jsou nazývány terminačními signály nebo také kodony bez vlastního smyslu, protože nejsou běžným kódem pro žádnou aminokyselinu. V případě, že dojde ke zničení terminačního signálu mezi strukturálními geny operonu, dochází ke vzniku spojených genů, které může mít za následek produkci chimérického proteinu, který sestává z dvou sledů aminokyselin podle příslušných genů, přičemž tyto sledy jsou mezi sebou vázány peptidovou vazbou. Že skutečně dochází k produkci chimérických bílkovin při spojení genů, bylo prokázáno v publikaci Benzer S. a Champe S. P., Proc. Nat. Acad. Sci, USA **48**, 114 (1962).

Byl také připraven vektor pro přenos rekombinantního plazmidu s obsahem té části operonu pro laktózu, která obsahuje operátor, promotor a podstatnou část strukturálního genu pro první enzym operonu, kterým je β -galaktosidáza. Tento postup byl popsán v publikaci Polisky B. a další, Proc. Natl. Acad. Sci USA **73**, 3900 (1976). Původní plazmid byl označen pSF2124 jako derivát ColEI a byl popsán v publikaci So M. a další Mol. Gen. Genet. **142**, 239 (1975). Oblast operonu pro laktózu byla odvozena od lambda pac 5 a postup byl popsán v publikaci Shapiro J. a další, Nature **224**, 768 (1969) při spojení 28S ribosomální DNA z *Xenopus laevis* bezprostředně za fragmentem genu pro β -galaktosidázu došlo k produkci RNA, schopné hybridizace s 28S DNA z *Xenopus laevis* za přítomnosti induktoru operonu pro laktózu. Mimoto některé kultury produkovaly určitý typ β -galaktosidázy s vyšší molekulární hmotností, než je hmotnost přírodního enzymu, takže patrně došlo k syntéze chimérické bílkoviny.

Expresí nižšího eukariotického genu z kvasinek po přenosu na *Escherichia coli* byla popsána v publikaci Ratzkin B a Carbon J. Proc. Nat. Acad. Sci, USA **74**, 487 (1977) a Struhl D. a Davis R. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **74**, 5255 (1977). V těchto pokusech měly určité klonované geny kvasinek schopnost doplnit nedostatek bakterií, do nichž byly přeneseny, přestože jiné geny kvasinek tuto schopnost neměly. Přenesené geny kvasinek obsahovaly svou vlastní řídicí oblast. Prostředky, jimiž je možno dosáhnout exprese přenesením genu z kvasinek tedy patrně závisí na poměrně vzácné možnosti přenosu celého strukturálního genu spolu s jeho řídicí oblastí. Mimoto může existovat pouze omezené množství řídicích

oblastí u kvasinek, jejichž funkce je zachována i v bakteriální buňce.

Podstata vynálezu

Vynález se týká vektoru pro přenos DNA, který obsahuje eukariotický gen, schopný exprese, dále mikroorganismu, který obsahuje eukariotický gen a v němž dochází k jeho expresi, minibuňky, obsahující eukariotický gen, v níž dochází k jeho expresi a způsobu produkce uvedeného plazmidu, mikroorganismu a minibuňky. Pod pojmem „vektor pro přenos a expresi“ se rozumí vektor pro přenos, který obsahuje eukariotický gen v takovém umístění vzhledem k řídicí oblasti, že může dojít k expresi genu v mikroorganismu, který obsahuje uvedený vektor. Podstatnou vlastností tohoto typu vektoru pro přenos a expresi je skutečnost, že heterologní gen, k jehož expresi má dojít, je vázán na prokariotický řídicí fragment. Řídicí fragment může sestávat pouze z části řídicí oblasti, která zajišťuje iniciaci transkripce a iniciaci translace a mimoto může obsahovat část strukturálního genu. Heterologní DNA musí být vázána na řídicí fragment takovým způsobem, aby genetickou informací bylo možno odečíst. Genetickou informací je možno odečíst tehdy, když tatáž skupina nukleotidů má za následek produkci správných aminokyselin v řídicím fragmentu i heterologním genu. V případě, že heterologní gen je vázán takovým způsobem, že informaci je možno odečíst původním způsobem, dojde při expresi genu, která je řízena řídicí oblastí k výrobě chimérické bílkoviny, v níž je produkt normálního genu vázán na produkt heterologního genu.

Je tedy možno zásadně postupovat dvojím způsobem. Spojením eukariotického genu s genem pro výrobu bílkoviny, běžně vyráběné nebo chráněné před rozpadem, je možno zvýšit stálost chimérické bílkoviny. S výhodou dojde k tomu, že chimérická bílkovina projde buněčnou membránou do růstového prostředí. V tomto případě je pak snadnější i čištění extracelulární bílkoviny. Druhou možností je vázat eukariotický gen na gen s žádoucími genetickými vlastnostmi, například na gen, jehož řídicí oblast má výhodné vlastnosti, které mohou usnadnit produkci vektoru pro přenos a expresi, jeho udržení v hostitelské buňce nebo rychlost syntézy chimérické bílkoviny.

Příkladem prvního postupu může být kryší růstový hormon. Gen pro kryší růstový hormon byl navázán na gen pro β -laktamázu z *Escherichia coli*, která přenáší odolnost proti ampicilinu. V případě, že se vektor tohoto typu užije k transformaci mikroorganismu, dochází u tohoto mikroorganismu ke schopnosti produkovat chimérické bílkoviny, v nichž je sled aminokyselin z části β -laktamázy spojen se sledem aminokyselin

pro prekursor krysího růstového hormonu RGH. Obdobným způsobem bylo možno spojit gen pro výrobu krysího prekursoru pro inzulin s genem pro produkci β -galaktosidázy s *Escherichia coli* a vytvořit výsledný plazmid. Při expresi tohoto plazmidu došlo k produkci chiméřní bílkoviny.

Základní požadavek pro použití způsobu podle vynálezu je ten, že musí vzniknout místo štěpení v oblasti genu, a to v jeho řídicí oblasti. Stejným způsobem musí vzniknout místo štěpení v heterologní DNA na hranici nebo v blízkosti, avšak vně nukleotidového sledu, který je kódem pro N-terminální aminokyselinu bílkoviny, k jejíž syntéze má dojít. Spojení prokariotického genu DNA s heterologní DNA musí být takové, aby způsob odečítání v prokariotickém genu měl tentýž směr jako v heterologní DNA. Štěpení se pak s výhodou provádí působením restriktivní endonukleázy, přičemž předem zvolená místa štěpení nesmí být citlivá na tentýž restriktivní enzym. Z tohoto důvodu po spojení ze směru odečítání v prokariotické DNA a v heterologní DNA tentýž.

Je možné spojit náhodně štěpené prokariotickou a heterologní DNA a pak provádět selekci získaného materiálu podle příslušných hledisek. V tomto případě však je naděje na správný sled odečítání 1/3, naděje na správnou orientaci 1/2, to znamená, že naděje na získání genu schopného exprese je 1/6, i v tomto případě však je možno správnou selekci dosáhnout žádaného materiálu. Je tedy možné způsobem podle vynálezu spojit jakýkoliv eukariotický gen nebo jeho fragment se zvoleným prokariotickým genem nebo jeho řídicím fragmentem a získat tak vektor, který je schopný exprese.

Podrobný popis způsobu podle vynálezu

K přenosu segmentu heterologní DNA na určité místo vektoru tak, aby došlo k expresi heterologní DNA a ke vzniku chiméřní bílkoviny je nutno zachovat několik podmínek. Především je zapotřebí zvolit funkční gen ve vektoru a do tohoto genu včlenit heterologní DNA. Volba fragmentu operonu závisí na proveditelnosti celého postupu. V případě použití operonu pro resistenci proti ampicilinu, který je kódem pro produkci enzymu β -laktamázy, jde o velmi výhodný postup, protože tento operon je již přítomen v celé řadě plazmidů, které jsou běžně pro tuto práci užívány a také z toho důvodu, že tento enzym se nachází v periplazmatických prostorech a je uvolňován při tvorbě sferoplastů. V případě, že je možno pozorovat totéž u chiméřní bílkoviny, je možno stabilizovat bílkovinu přenosem do periplazmatického prostoru nebo vyloučením této bílkoviny z vnitřního prostoru buňky. Tímto způsobem je také možno velmi zjednodušit čištění této bílkoviny. V tomto smyslu je

velmi atraktivní lac-operon, protože tento operon je geneticky podrobně prostudován a je k dispozici celá řada mutant, které mohou změnit rychlost exprese genu při řízení lac operátorem. Je nutno vzít v úvahu také možnost biosyntézy chiméřních bílkovin, které je možno snadno štěpit enzymaticky nebo chemicky a tak oddělit od chiméřní bílkoviny žádaný segment.

Gen, na nějž má být vázána heterologní DNA, může být štěpen nespecifickým nebo specifickým způsobem. Nespecifické štěpení je možno provést různými endonukleázami nebo ultrazvukem. V tomto případě obvykle vzniknou jednotné molekuly. Příslušnými mikrobiologickými a selekčními způsoby je pak možno stanovit, zdali došlo k plazmidu, který je schopen exprese. Z materiálů, které uvedeným postupem mohou vzniknout, je tento případ poměrně vzácný. Z tohoto důvodu klade štěpení na nespecifických místech velké nároky na selekční postupy i na citlivost těchto postupů a na ostatní způsoby stanovení.

S výhodou se proto užívá specifického štěpení při použití předem zvolené restriktivní endonukleázy, která působí na známém místě. S výhodou se postup provádí tak, že existuje ještě další místo pro působení enzymu, a to buď pro působení téhož enzymu, nebo pro působení jiné restriktivní endonukleázy. Přítomnost tohoto místa dovoluje odstranit určitý úsek plazmidu a nahradit tento úsek novým segmentem, který obsahuje heterologní DNA.

Bez ohledu na to, jakým způsobem je na začátku odštěpen prokariotický gen, je možno modifikovat jeho zakončení tak, že se na tato zakončení naváží nukleotidy, čímž je možno vytvořit nebo změnit specifická místa pro působení restriktivního enzymu nebo je možno usnadnit vzájemnou vazbu zakončení. Je známa celá řada exonukleáz, které hydrolyzují fosfodiesterové vazby na zakončeních 3' a 5'. Celá řada restriktivních endonukleáz štěpí DNA s dvojitým řetězcem tak, že vznikají krátké jednoduché řetězce u odštěpených konců. Tyto řetězce je popřípadě možno odstranit exonukleázami, například nukleázou S1, která je specifická pro určitý substrát. Je však možno také získat párová zakončení tak, že se prodlouží komplementární řetězec navázáním krátkého segmentu DNA, který vyplní nepárovou oblast. K tomuto účelu je možno užít enzym DNA polymerázu. Další možností je přidat nukleotidy náhodným způsobem. Například při náhodné vazbě kyseliny desoxyguanilové (dG) a desoxycytidylové (dC) může vzniknout sled GGCC, který se odečítá od zakončení 5' k 3' zleva doprava. Tento sled je místem působení enzymu Hae III. Použitím náhodné vazby nukleotidů je tedy možno vytvořit nové místo působení pro restriktivní enzymy, přestože tato místa budou náhodně rozložena vzhledem k původnímu zakonče-

ní a vzhledem ke způsobu odečítání. Výhodná a specifická metoda k modifikaci těchto zakončení je syntéza oligonukleotidů, které se účastní této vazby a která je popsána v publikaci Scheller R. H. a další, *Science* **196**, 177 (1977). Tímto způsobem je možno přidat na zakončení molekuly DNA jakýkoliv požadovaný sled nukleotidů. Tím je tedy možno i zařadit jakékoliv místo pro působení restriktivního enzymu. V zásadě je možno navázat i dlouhé sledy nukleotidů. Je pravděpodobné, že bude možno syntetizovat i řídicí oblast, která řídí začátek transkripce a translace a že bude také možno takto vzniklý sled navázat přímo na heterologní DNA.

Tentýž způsob pro modifikaci zakončení fragmentu prokariotického operonu je možno použít i v případě heterogenní DNA. Je samozřejmé, že toto působení nesmí narušit nebo modifikovat sled, který je kódem pro bílkovinu, která má být syntetizována. Heterologní fragment DNA, k jehož přenosu má dojít, nesmí obsahovat sled pro prokariotickou řídicí funkci a s výhodou má obsahovat místa pro působení restriktivního enzymu vně oblastí, k jejíž expresi má dojít. S výhodou jsou tato místa vhodná pro působení téže restriktivní endonukleázy, která byla užita k vynětí oblasti plazmidu, do níž má být vsazen fragment heterogenní DNA. Tento požadavek není absolutní a je v případě potřeby možno jej obejít například chemickým způsobem. Podstatné je pouze to, aby místa štěpení operonu a heterologní DNA bylo možno navázat a aby tato místa byla odečítána stejným způsobem. Tato podmínka je nutná k tomu, aby bylo možno správně odečíst heterologní kodony. Například v případě, že se místo štěpení v operonu nachází mezi tripletu, je nutné, aby místo štěpení v heterologní DNA bylo umístěno rovněž mezi tripletu. V případě, že místo štěpení v operonu se nachází za prvním nukleotidem směrem od zakončení 3' v tripletu, je nutné, aby místo štěpení v heterologní DNA bylo uloženo za dvěma nukleotidy od zakončení 5' tripletu a podobně.

Dále je nutné, aby heterologní DNA byla vložena ve správném směru. Směr transkripce heterologního genu musí být tentýž jako směr transkripce operonu. Jinak je informace v heterologní DNA odečítána opačným způsobem a je tedy beze smyslu. V některých případech je možno stanovit, zda došlo ke správnému včlenění. V jiných případech je možno provádět selekci, protože ke správné orientaci dochází z 50% pravděpodobností.

Je také nutné navrhnout selekční systém k tomu, aby bylo možno identifikovat mezi produkty reakce, katalyzované DNA-ligázou ty vektory, které obsahují správnou kombinaci polynukleotidových fragmentů.

Obecný postup bude pochopitelnější v případě, že bude doplněn popisem specifických technik, které jsou užívány při provádění

způsobu podle vynálezu. Na obr. 1 jsou uvedeny stupně, které se používají při vytváření plazmidu, který obsahuje převážnou část genu pro krysí proinzulín ve vazbě na řídicí oblast a krátký úsek na strukturálním genu β -galaktosidázy. Na obr. 1 až 4 je DNA s dvojítm řetězcem znázorněna jednoduchou čarou a plazmidová DNA, která má tvar smyčky, je znázorněna kruhem. Přibližné umístění místa působení restriktivních endonukleáz je rovněž vyznačen. Geny, o které běží, to jest operon pro laktózu (*lac*), kód pro odolnost proti ampicilinu (*Ap^r*), který je kódem pro produkci β -laktamázy a odolnost proti tetracyklinu (*Tc^r*) jsou znázorněny jako oblouky, které jsou zakresleny rovnoběžně s přibližným umístěním těchto úseků relativní k místům působení restriktivních endonukleáz a k sobě navzájem. Šipky znázorňují směr transkripce pro každý z uvedených genů.

Plazmid pBH20 s včleněným fragmentem operonu pro laktózu lambda *plac5* pro štěpení *HaeIII* v blízkosti řídicí oblasti byl již předem sestaven, jak bylo popsáno v publikaci Itakura K. a další, *Science* **198**, 1077 (1977). V případě, že na pBH20 působí *EcoRI* restriktivní endonukleázy, dojde k redukci lineární plazmidové molekuly s jednoduchým řetězcem a komplementárními zakončeními. Tato zakončení je možno oddělit působením nukleázy *S1*. Výsledná molekula se podrobí působení DNA-ligázy za současného navázání syntetického nukleotidového deka-meru, který obsahuje místo působení pro-restriktivního enzymu *HindIII*. Tato vazba nepárových zakončení byla popsána v publikaci Sgaramella V. a další, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **67**, 1468 (1970). Účelem přidání místa působení pro *HindIII* je umožnit specifickou vazebnou reakci s fragmentem genu pro proinzulín. Vazba působením DN-ligázy poskytuje vyšší výtěžek navázaných molekul v případě, že zakončení jsou kohezivní. Fragment proinzulínového genu, pAU-1 obsahuje celý strukturální gen pro proinzulín s výjimkou dvou 2 N terminální aminokyseliny. Ze znalosti sledu nukleotidů ve fragmentu *lac*-genu v pAU-1 je možno usuzovat, že odečítání genu proinzulínu bude souhlasit s odečítáním *lac*-fragmentu. Sled *lac* v oblasti místa štěpení enzymem *EcoRI* je tento

5'-GGATTCAGTGG-3'

3'-CCTAAGTGTGACCTTAA-5'

Působením nukleázy *S1* má být odstraněn pouze terminální nepárový sled TTAA. V některých případech dojde k tomu, že nukleáza *S1* oddělí z řetězce ještě další zbytky, což je nežádoucí, protože může dojít k porušení způsobu odečítání. V tomto případě však došlo ke správnému působení enzymu a navázání dalšího sledu vzniklo místo pro

působení Hae III v místě spojení sledu po působení HindIII a lac-DNA:

5'-GGATTC~~ACTGGCCAAGCTT~~GG

3'-CCTAAGTG~~ACCGGTT~~CGAACC

místo působení HaeIII.

Tímto způsobem bylo možno provádět kontrolu správného produktu nezávisle na expresi tak, že byl prokázán vznik nového místa pro působení HaeIII.

Proinzulínový fragment a fragment lac genu byly podrobeny působení enzymu Hind-III, čímž vznikla kohezivní zakončení, která byla spojena působením T4 DNA ligázy. Produktem tohoto působení pak byly transformovány buňky *Escherichia coli*. Tyto buňky pak byly podrobeny selekci podle své schopnosti růst za přítomnosti ampicilinu. Ty transformované buňky, které obsahovaly fragment proinzulínového genu nebyly odolné při koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ tetracyklinu. Sled pAU-1 v pLRI-1 je oddělen místy působení pro HindIII, který byl užít pro včlenění tohoto sledu. Uložení sledu pAU-1 v pLRI-1 je takové, že heterologní DNA přerušuje část promotoru pro gen odolnosti proti tetracyklinu a tímto způsobem snižuje jeho expresi. Avšak v případě, že sled pAU-1 je orientován tak, že část dA:d T genu přiléhá ke zbývajícím částem sledu promotoru, dojde k určité expresi genu pro odolnost proti tetracyklinu. V důsledku toho může sled pAU-1 včleněný v příslušné orientaci působit vznik odolnosti k nízkým koncentracím tetracyklinu řádu 5 $\mu\text{g/ml}$ v bakteriích, které obsahují tento vektor. Tato skutečnost byla použita pro selekci vektorů se správnou orientací uvedeného sledu. Pak byly transformované kolonie sledovány vzhledem k existenci nového místa pro HaeIII izolací plazmidů, působením HaeIII a analýzou takto vzniklých fragmentů elektroforézou na gelu. Plazmidy, které splňovaly všechny požadavky, byly zvoleny k dalším pokusům na expresi a označeny pLRI-1, jak je schematicky znázorněno na obr. 2.

Byly užity dvě metody sledování exprese proinzulínového genu v pLR-1. Především byla srovnávána velikost bílkovin, které byly produkovány transformovanými buňkami s velikostí bílkoviny v molekule, které byly produkovány buňkami transformovanými pBH20 elektroforézou na akrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (SDS). V oblasti očekávané chimérické bílkoviny se nacházela celá řada dalších bílkovin, takže chimérická bílkovina nebylo možno nalézt. Druhý pokus byl proveden při použití transformovaných minibuněk. Tyto buňky jsou produkovány v průběhu růstu mutanty *Escherichia coli* P678-54, jak je popsáno v publikaci Adler H. I. a další, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **57**, 321 (1966). Kromě normálního buněčného dělení dochází u buněk mutanty P678-54 ještě k aberantnímu dělení, jehož

důsledkem je tvorba minibuněk, které jsou daleko menší, než původní buňky a neobsahují původní buněčnou DNA. V důsledku toho nemají tyto minibuňky schopnost provádět syntézu bílkovin, řízenou DNA. Jinak se zdají minibuňky normální, mají buněčnou stěnu normálního vzhledu a také buněčná plazma je zjevně stejná s běžnou buněčnou plazmou. V případě transformace plazmidem produkuje kmen minibuněk další minibuňky, které obsahují kopii plazmidů. Tyto minibuňky mají omezenou schopnost exprese plazmidového genu. Počet bílkovin, které mohou být produkovány těmito minibuněkami, je podstatně omezen ve srovnání s normálními buňkami, a tato skutečnost vytváří základ pro analýzu syntézy bílkovin, řízenou plazmidem. Tato analýza se pak provádí elektroforézou na SDS-akrylamidovém gelu, jak bylo popsáno v publikaci Meagher R. B. a další, *Cell* **10**, 521 (1977). Výsledky této analýzy při použití minibuněk, transformovaných působením pLRI-1 byly rovněž negativní.

Výsledky, které byly až dosud získány při použití pLRI-1, ukazují na nízkou úroveň zjištěné exprese při použití tohoto plazmidu. Chimérická bílkovina je novou látkou s novým sledem aminokyselin. V přítomné době je nemožné předpovědět do detailu konfiguraci nebo funkční vlastnosti bílkovin ze sledu jejich aminokyselin. Není také možno předem určit odpověď buňky na novou bílkovinu. Chimérická bílkovina může být nestálá v nitrobuněčném prostředí ze zatím neznámých důvodů. Bílkovina může být rozložena nitrobuněčnými proteázami nebo se může vázat na nerozpustné složky buněk. Délka β -galaktosidázového genu, který přispívá k vytváření chimérické bílkoviny, není jediným faktorem, protože bylo možno pozorovat i expresi vaječného albuminu, vázaného na β -galaktosidázový řetězec téže délky. S největší pravděpodobností je kritickým faktorem povaha a vlastnosti specifické chimérické bílkoviny, k jejíž expresi dochází. Protože pLRI-1 má správný způsob odečítání a správnou orientaci, je možno očekávat, že při použití příslušného testu bude nakonec možno prokázat expresi proinzulínového genu.

Při druhém typu pokusů bylo užito velké molekuly heterologní DNA, která obsahovala celý gen proinzulínu a mimoto 13 aminokyselin preinzulínového sledu. Na obr. 3 je znázorněno konstrukční schéma plazmidu, do něhož byl členěn gen krysího prekursoru preinzulínu. Plazmid pBGP120, popsáný ve shora uvedené publikaci Polisky B. a další byl použit jako zdroj fragmentu lac operonu, který je kódem přibližně pro 1000 aminokyselin. Plazmid pBR322, popsáný v publikaci Bolívar F. a další, *Gene* **2**, 95 (1977) byl použit k přenosu lac operonu a jeho fragmentu vzhledem ke svému menšímu rozměru a snadné transformaci, růstu

a izolace. Oba plazmidy byly odštěpeny restrikčními endonukleázami HindIII a EcoRI z každého plazmidu byly získány dva fragmenty, jejichž molekulární hmotnost je uvedena na obr. 3. Směs fragmentů byla vázána působením T4 DNA ligázy, čímž byly získány plazmidy, zkřížené produkty a pravděpodobně ještě celá řada komplexních forem. Všechny kombinace bylo možno rozlišit elektroforézou na agarózovém gelu.

Transformanty byly podrobeny selekci na plotnách XGal (Miller J., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972) s obsahem ampicilinu. Kolonie s β -galaktosidázou jsou na těchto plotnách modré a rostou pouze ty kolonie, které obsahují Ap^r. Aby bylo možno zjistit správný rozměr plazmidu, bylo odebráno několik modrých kolonií a z každé této kolonie byly znovu vypěstovány malé kultury, plazmidy byly znovu izolovány a byla zjišťována jejich velikost na agarózovém gelu. Správná velikost je $6,5 \times 10^6$ daltonů. Aby bylo možno dále potvrdit strukturu požadovaného plazmidu, byly měřeny rozměry fragmentů po štěpení enzymy HindIII a EcoRI elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Diagram pro výsledný plazmid, který byl označen pTS-1, je uveden na obr. 4.

Aby bylo možno sestavit fragment inzulinového genu, který je kódem pro celý sled proinzulinu, byly navázány dva předem klonované fragmenty, jejichž sled nukleotidů je znám, a to pAU-1 a pAU-2, jak bylo popsáno ve shora uvedené publikaci Ullrich A. Dva fragmenty se ve svém sledu překrývají a mají společné místo AluI v překrývající se oblasti. Toto místo bylo užito ke štěpení. Předtím však byly působením alkalické fosfatázy odstraněny terminální fosfatové skupiny. Štěpením vznikly nepárové konce, a protože ke štěpení došlo v oblasti společného sledu, došlo by po novém spojení obou fragmentů k rekonstrukci celého genu. Dva větší fragmenty, jejichž spojení bylo pozorováno, byly čištěny elektroforézou před působením ligázy. Po působení ligázy byly frakcionovány tři zásadně možné produkty elektroforézou na gelu a byl izolován požadovaný fragment střední velikosti. Tímto způsobem bylo možno včlenit i pAU-1 i pAU-2. Zbývající zakončení této molekuly mají kohezivní zakončení typu HindIII. Celá molekula byla tedy okamžitě včleněna do pBR322 v místě, vhodném pro štěpení enzymem HindIII a ke zbývajícím stupňům celého postupu bylo pak možno užít transformantů, které nesly výsledný plazmid.

Inzulínový gen byl uvolněn z plazmidu působením enzymu HindIII a byl čištěn. Koncové skupiny byly modifikovány působením nukleázy S1 k odstranění jednoduchých řetězců a pak byla provedena vazba na následující sled nukleotidů:

TGAATTCA

ACTTAAGT .

Tímto způsobem bylo získáno místo, specifické pro působení enzymu EcoRI, jak bylo popsáno v publikaci Greene P. J. a další, J. Mol. Biol. **99**, 237 (1975). Na modifikovanou DNA pak bylo působeno EcoRI a byla včleněna do pTS-1 v místě, vhodném pro působení EcoRI. Tímto způsobem mohlo být v místě pro působení EcoRI dosaženo správného způsobu odečtení genu pro produkci β -galaktosidázy, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Polisky B. a další. Test na správnou orientaci včleněného inzulinového genu byl proveden při využití místa pro působení HaeIII ve včleněném inzulinovém genu, protože toto místo je uloženo asymetricky vzhledem k ostatním místům pro působení HaeIII v plazmidu. Správná orientace má za následek možnost předpovědět velikost fragmentů po štěpení HaeIII. Výsledný plazmid se správně včleněným inzulinovým genem byl označen pLRI-2 a je charakterizován diagramem, uvedeným na obr. 2. Obdobným postupem je možno dojít ke konstrukci plazmidu pro expresi lidského inzulinu při zachování svrchu uvedených zásad.

Reakční sled pro navázání genu pro kryší růstový hormon na gen pro β -laktamázu je dalším příkladem tohoto postupu. Na obr. 5 je tento postup diagramaticky znázorněn. Na obr. 5 je znázorněna DNA s dvojitým řetězcem jednoduchou čarou a plazmidová DNA, která má formu zavřené smyčky, je znázorněna kruhem. Přibližné místo pro působení restrikčního enzymu je rovněž označeno. Relevantní geny, a to pro kryší růstový hormon (RGH), pro odolnost proti ampicilinu (AMP), který je současně kódem pro redukci β -laktamázy a pro odolnost proti tetracyklinu (TET) jsou znázorněny jako čtyřúhelníky v přibližném umístění vzhledem k místům působení restrikčních enzymů a vzhledem k sobě navzájem.

Původní plazmid s obsahem RGH genu byl odvozen způsobem podle přihlášky číslo 897 710 a podle publikace Seeburg P. H. a další, Nature **270**, 486 (1977) a byl označen pRGH-1. Sled nukleotidů pro kryší růstový hormon, obsažený v pRGH-1 byl stanoven a srovnáván s těmi částmi aminokyselinového sledu kryšího růstového hormonu, které jsou známy. Sled nukleotidů pro plazmid RGH je dlouhý přibližně 800 párů bází a zahrnuje nukleotidy, které jsou kódem pro 26 aminokyselin prepeptidu a 29 nukleotidů, které jsou částí 5'-nepřenesené oblasti růstového hormonu, převážně jeho mRNA. Místo obsahuje sled přibližně 100 nukleotidů, to jest celou 3'-nepřenesenou oblast. Místo pro působení restrikční endonukleázy PstI je možno nalézt mezi 23. a 24. aminokyselinou sledu pre-RGH. Toto místo rovněž existuje v genu pro odolnost proti ampicilinu v plazmidech pMB9 a pBR322. RGH sled

v pRGH-1 je ohraničen místy pro působení HindIII, který byl užít pro jeho včlenění.

Gen o 800 párech bází pro RGH byl izolován působením HindIII na pRGH-1 a byl čištěn elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Plazmid pMB9, který obsahuje jediné místo pro působení HindIII v promotoru pro odolnost proti tetracyklinu, byl štěpen enzymem HindIII a podroben působení bakteriální alkalické fosfatázy, aby nedošlo ke zpětné vazbě těchto konců v dalších stupních, jak bylo uvedeno v přihlášce č. 898 887 a ve shora uvedené publikaci Ullricha A. a dalších. Směs rozštěpené plazmidové DNA a segmentu RGH DNA se podrobí působení DNA ligázy, čímž vznikne plazmid, který je možno označit pMB9 (RGH), jak je znázorněno na diagramu v obr. 5. Výsledné plazmidy byly použity k transformaci *Escherichia coli* a získány zpět selekcí kolonií, odolných proti tetracyklinu v koncentracích 5 $\mu\text{g/ml}$.

Zásadně byly možné dvě orientace sledu RGH. Žádanou orientaci bylo možno odlišit přípravou radioaktivně značeného plazmidu z izolátů jediné kolonie s následným štěpením endonukleázami EcoRI a PstI. Rozměr značených fragmentů bylo možno stanovit elektroforézou na gelu. Orientace RGH segmentu v opačném směru má za následek, že místo pro působení PstI leží blíže k místu pro působení EcoRI, čímž vzniká po štěpení oběma restrikcími enzymy menší fragment, než bylo možno očekávat při správné orientaci.

Při následujícím čištění správně orientovaného pMB9 (RGH) byl plazmid podroben působení endonukleáz PstI a BamHI. Plazmid pBR322, znázorněný na obr. 5, byl rovněž podroben působení enzymů PstI a BamHI. V plazmidu pBR322 se nachází místo pro působení enzymu PstI mezi aminokyselinami 182 a 183, počítáno od N-zakončení β -laktamázového genu, a to od první z 23 aminokyselin bílkoviny, která je prekursorem β -laktamázy. Místo pro působení BamHI je v genu pro odolnost proti tetracyklinu na přesně stejném místě jako v pMB9, protože tato oblast pBR322 byla odvozena od pMB9, jak je popsáno ve shora uvedené publikaci Bolivar F.

Po působení enzymu se pBR322 podrobí působení bakteriální alkalické fosfatázy, aby nemohlo dojít k opětovné vazbě získaných zakončení. Fragmenty pak byly spojeny působením DNA ligázy s rozštěpením pMB9 (RGH).

Výsledná struktura plazmidu je znázorněna na obr. 1 a je označena pExRGH, aby bylo možno označit úlohu tohoto plazmidu pro expresi. Po transformaci produkty působení ligázy se transformované bakterie podrobí selekci na odolnost proti vysokým koncentracím tetracyklinu 20 $\mu\text{g/ml}$. Protože původní plazmid pMB9 (RGH) je odolný pouze proti koncentraci tetracyklinu 5 $\mu\text{g/ml}$ a po působení fosfatázy nemohlo dojít

ke vzájemnému spojení fragmentů pBR322 bylo možno oddělit elektroforeticky malý fragment a byly získány kolonie jediného typu, v nichž docházelo k expresi plazmidu. Plazmid je odolný proti tetracyklinu vzhledem k opětovnému vytvoření úplného genu pro odolnost proti tetracyklinu v místě štěpení BamHI. Odvození každé oblasti plazmidu je tedy toto: oblast ve směru hodinových ručiček počíná v místě štěpení PstI, přechází přes místo štěpení EcoRI a HindIII k místu pro štěpení enzymem BamHI, celá tato oblast pochází z pBR322. Od místa štěpení BamHI k dalšímu místu štěpení EcoRI až do místa štěpení HindIII je odvozena od pMB9 a oblast označovaná RGH se nachází mezi místem štěpení HindIII až do místa štěpení PstI, které má svůj původ v pRGH-1.

Úplný sled nukleotidů DNA růstového hormonu a genu pro β -laktamázu v pBR322 jsou známy a popsány například ve shora uvedené publikaci Seeburg P. a další a v publikaci Sutcliffe a další, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, (1978). Rekonstrukce těchto dvousledů jejich spojením v místě štěpení PstI determinuje fázi sledu pro pre-RGH, protože byla determinována i orientace úseku RGH v pMB9. Na obr. 6 je znázorněn sled v oblasti místa PstI v pExRGH a je naznačen také správný způsob odečítání pre-RGH, který je v tomto případě zachován. Z toho vyplývá, že produkt, pro nějž je tato oblast kódem, je chimérický polypeptid, který sestává z N-terminálních 182 aminokyselin β -laktamázy, z nichž prvních 23 aminokyselin tvoří část předběžného sledu, pak následuje 23 aminokyselin předběžného sledu RGH a 190 aminokyselin vlastního RGH. Elektroforézou a imunochemickým způsobem je možno prokázat, že transformované buňky *Escherichia coli* skutečně produkují takovou bílkovinu po transformaci pExRGH, jak bude prokázáno v následujících příkladech.

V oblasti produkce bílkovin, pro něž jsou kódem plazmidy, jsou dvě základní obtíže. První z těchto obtíží je obecný problém, který spočívá v tom, že vzniklá bílkovina se získává v čisté formě z růstového prostředí nebo z buněčného extraktu. K tomuto účelu je možno užít řady metod. V některých případech jsou specifické bílkoviny vylučovány do živného prostředí. K tomuto úkazu dochází například v případě β -laktamázy, jejíž velká část je uvolňována do živného prostředí, jakmile dochází k přeměně buněk na sporoplasty. Nitrobuněčný transport chimérické bílkoviny není možno předpokládat na základě chování kterékoliv bílkoviny, která vytváří její strukturu. Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným bylo v případě polypeptidů produkováných minibuňkami kmene P678-54 s obsahem pExRGH nebo pBR322 několik rozdílů, jak bylo možno očekávat v případě dvou podobných, avšak odlišných plazmidů.

Je překvapující, že nový polypeptid má molekulární hmotnost přibližně 47 000 v případě, že jde o minibuňky s obsahem pExRGH. Tento údaj je v mezích experimentální chyby očekávané molekulární hmotnosti chimérické bílkoviny, která obsahuje β -laktamázový fragment a pre-RGH a jejíž molekulární hmotnost by měla být 44 300. Na druhé straně minibuňky s obsahem pExRGH nevytváří dva polypeptidy, které by odpovídaly pre- β -laktamáze a β -laktamáze a které jsou přítomny v minibuňkách s obsahem pBR322. Detaily tohoto pokusu jsou uvedeny v příkladu 2.

Shora uvedený způsob je vhodný pro vytváření plazmidu, který je schopný exprese a obsahuje gen lidského růstového hormonu (HGH). Až dosud byl klonován pouze fragment genu HGH, který obsahuje celý strukturální gen pro hormon s výjimkou prvních 23 aminokyselin. Fragment HGH byl včleněn do plazmidu působením enzymu HindIII a je tedy možno jej tímto enzymem izolovat, jak bylo popsáno ve shora uvedené publikaci Seeburg a další a přihlášce č. 897 710. Zakončení je možno modifikovat tak, že se nepárová zakončení vyplní při použití reakce, katalyzované DNA polymerázou. Výsledný fragment HGH s nepárovými zakončeními je možno spojit s podobným fragmentem β -laktamázového genu, který vzniká po působení enzymu HindIII. Způsob pro vytváření a expresi plazmidu s obsahem celého sledu HGH bude v zásadě podobný, jakmile dojde ke klonování celého sledu, který je kódem pro tento hormon.

Je zřejmé, že obdobným způsobem je možno připravit i vektory pro další bílkoviny, které budou rovněž schopny exprese. Například exprese lidského růstového hormonu je možno shora uvedeným způsobem dosáhnout, stejně jako exprese růstových hormonů skotu, vepře a ovce. Obdobným způsobem je popsanou metodou možno užít i pro expresi genu pro lidský inzulin a genů pro inzulinu jiných živočišných druhů. Protože jde o obecný způsob, je možno jej použít pro dosažení toho, aby mikroorganismus produkoval jakoukoliv eukariotickou bílkovinu až na zřejmé výjimky, kterými budou například bílkoviny toxické pro mikroorganismus.

V následujících příkladech bude podrobněji popsáno, jak je možno připravit vektor, mikroorganismy i zajistit expresi genu RGH a genu pro krysí inzulin v těchto mikroorganismech.

Příklad 1

Pro konstrukci vektorů, schopných exprese a průkazu syntézy chimérické bílkoviny bylo užito následujících postupů:

A. Růst, izolace a čištění plazmidů se provádí tak, že se transformované buňky pěstují přes noc ve vhodném objemu živného prostředí, například 500 ml, za stálého tře-

pání při teplotě 37 °C. Je možno užít kultur, transformovaných různými plazmidy typu ColEI, například pBR322, a tyto kultury je možno podrobit působení chloramfenikolu v koncentraci 170 μ g/ml na dobu 12 až 16 hodin, čímž je možno dosáhnout vyššího množství plazmidu. Buňky se oddělí odstředěním, promyjí se 0,01 M Tris, 0,001 M EDTA, o pH 8, znovu se uvedou v suspenzi v 10 ml chladného 25% roztoku sacharózy v 0,05 M Tris a 0,001 M EDTA o pH 8. Pak se přidají 2 ml lysozymu o koncentraci 5 mg/ml v 0,25 M Tris o pH 8 a pak ještě 4 ml 0,25 M EDTA o pH 8. Po 5 až 10 minutách inkubace v ledové drti se buňky rozruší přidáním 0,1 objemového % přípravku Triton X-100 (Rohmer a Haas Corp. Rutherford, N. J.) v Tris-EDTA pufru o pH 8. Po opatrném promíchání se směs inkubuje 15 minut v ledové drti. Výsledný rozrušený materiál se odstřeďuje při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 25 minut v rotoru SS34 odstředivky Sorval (Dupont Instruments, Wilmington, Del.). Supernatant se slije a dále se čistí chromatografií na Sephadexu G-100 (Pharmacia Chemical Corp., Uppsala, Švédsko), sloupec se vymývá 0,2 M NaCl, 0,05 M Tris a 0,001 M EDTA o pH 8. DNA, která se stanoví absorpcí při 260 nm, se vysráží přidáním 2 objemů chladného ethanolu o koncentraci 95 % (hmotnostní/objemová %), 0,03 objemu 3 M octanu sodného s následujícím stáním přes noc při teplotě -20 °C. Sraženina se oddělí, znovu se uvede v suspenzi v Tris-EDTA pufru a odstřeďuje se v CsCl s obsahem ethidiumbromidu a propidiumjodidu. Zkumavka o rozměru 1,2 x 5 cm obsahuje 2,2 g CsCl, 2,1 ml vzorku a 0,15 ml propidiumjodidu v koncentraci 2 mg/ml ve vodě. Zkumavky se odstředí při 36 000 otáčkách za minutu po dobu 18 až 24 hodin při teplotě 20 °C v rotoru SW39 (Beckman Instrument Co., Fullerton, Kalifornie) nebo v ekvivalentním rotoru. Frakce s obsahem DNA se nechají projít sloupcem kationtoměniče k odstranění propidiumjodidu a získaný materiál se dialyzuje proti 0,01 M Tris, 0,001 M EDTA o pH 8 a 0,3 M octanu sodnému k odstranění zbytku CsCl.

B. Transformace *Escherichia coli* RR-1 se provádí tak, že se pěstuje 10 ml kultury v bujónu L přes noc při teplotě 37 °C, pak se kultura zředí 1:50 objemovým dílům a 25 ml zředěné kultury se pěstuje tak dlouho, až se dosáhne hustoty 2 až 5 x 10⁸ buněk/ml (střed log fáze). Buňky se oddělí odstředěním, znovu se uvedou v suspenzi ve 25 ml 10 mmolů NaCl, znovu se odstředí a znovu se uvede v suspenzi ve 20 ml chladného 30 mmolů CaCl₂. Pak se buňky uloží na 20 minut do ledové drti, za studena se odstředí a znovu se uvedou v suspenzi v 1 ml 30 mmolů CaCl₂. K 0,2 ml buněk se přidá 0,1 ml DNA, 10 pg/ml v 30 mmolech CaCl₂, 0,01 M Tris, a 0,001 M EDTA o pH 7,5. Směs se ho-

dinu inkubuje v ledové drti, pak se přenese na 90 sekund do teploty 42 °C a pak se přenese zpět do ledové drti. Přidá se živné prostředí, bohaté na živné látky, například 3 ml bujónu L a buňky se pak pěstují při teplotě 37 °C po dobu 3 až 12 hodin před nanesením na plotny.

Transformace *Escherichia coli* X1776 se provádí obdobným způsobem, tak jak bylo popsáno v US přihlášce č. 897 709.

C. Restrikční endonukleázy je možno získat z celé řady komerčních zdrojů, jak je popsáno ve shora uvedené publikaci Ulrich A. a další, Seeburg P. H. a další a v US přihláškách č. 897 709 a 897 710. V těchto publikacích jsou rovněž popsány podmínky inkubace pro štěpení DNA působením restrikčních endonukleáz.

D. T4 DNA-ligázu je možno získat z Bethesda Research Labs, Rockville, Md. Podmínky pro tuto reakci jsou popsány ve shora uvedených publikacích Ulrich A. a další, Seeburg P. H. a další, Sgaramella a další a v US přihláškách č. 897 709 a 897 710.

E. Elektroforéza na gelu byla prováděna způsobem podle publikací Dingman C. W. a Peacock A. C., *Biochemistry* **7**, 659 (1968) a Maniatis, T. a další, *Biochemistry* **14**, 3787 (1975).

F. V některých případech bylo možno provádět imunologické zkoušky v případě možnosti čištění protilátky a antigenu, a také proto, aby bylo možno vyloučit vliv různých nečistot, přítomných v materiálu, který byl užít jako antigen, a podle příjmu nebo při imunizaci zvířat. Bylo užito chromatografie, při níž stacionární fází byla Sepharose 4B, Trademark Pharmacia Chemical Corp, Uppsala, Švédsko) s protilátkou nebo antigenem kovalentně vázaným po působení bromkyanu, jak bylo popsáno v publikaci March S. C. a další *Anal. Biochem.* **60**, 149 (1974). Vzorek, který byl čištěn byl nanesen na sloupec v chloridu sodném s fosfátovým pufrům, pak byl sloupec promyt 15 objemy téhož pufru a 5 objemy 0,05 M octanu sodného o pH 4,5, načež byl vymýván 0,05 M glycinu s kyselinou chlorovodíkovou o pH 2,2.

G. Ke zjištění chimérické bílkoviny s obsahem inzulínu nebo růstového hormonu bylo užito radioimunologických zkoušek. Byly zkoumány lyzáty buněk, transformovaných plazmidem, a to buď v surovém stavu nebo po částečném čištění běžným způsobem. Byly také připraveny série ředění, k nimž byla přidána protilátka proti hovězímu inzulínu (Miles Laboratories, Elkhart, Ind.), proti C-peptidu inzulínu (Yanaiharu C. a další, Symposium on Proinsulin, Insulin and C-peptide, Tokushima, Japonsko 1978, koordinováno Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) nebo proti krysímu růstovému hormonu, kte-

rý byl připraven imunizací samců opic Rhesus proti čištěnému růstovému hormonu krysy. Značené antigeny byly (¹²⁵I)-insulin (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.), (¹²⁵I)-tyrosylovaný C-peptid krysy (Yanaiharu a další) nebo (¹²⁵I)-růstový hormon. Postup byl prováděn modifikací způsobu, popsaného v publikaci Mergan a Lazarow, *Diabetes* **12**, 115 (1963), modifikace byla popsána v publikaci Kessler S. W., *J. Immunol.* **115**, 1617, (1975) a bylo v ní užito buněk *Staphylococcus aureus* C místo druhé protilátky k vysrážení komplexu antigenu s protilátkou.

H. Stanovení exprese bylo prováděno způsobem, který byl popsán v publikacích Erlich, H. A. a další, *Cell* **10**, 681 (1978) a Broome S. a Gilbert W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 2746 (1978).

Příklad 2

V tomto příkladu je popisována analýza značení bílkovin po syntéze transformovanými buňkami. Bílkoviny byly značeny přidáním [³⁵S]-methioninu, [³H]-aminokyselin nebo [¹⁴C]-aminokyselin k růstovému prostředí. Pak byly připraveny surové nebo částečně čištěné lyzáty a bílkoviny byly frakcionovány elektroforézou na akrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným způsobem podle publikace Lemmli U. K., *Nature* **227**, 680 (1970) nebo dvourozměrnou elektroforézou na gelu se stanovením isoelektrického bodu, popsanou v publikaci O'Farrell P. H. a další *J. Biol. Chem.* **250**, 4007 (1975). Při prvním způsobu dochází k frakcionaci bílkovin podle molekulární hmotnosti, při druhém mimoto ještě podle celkového iontového náboje. Radioaktivní bílkoviny je pak možno zjistit autoradiografií, tak jak bylo popsáno svrchu v publikacích Ulrich A. a další nebo Seeburg P. H. a další a v US přihláškách č. 897 709 a 897 710.

Ke snížení počtu značených bílkovin bylo v některých případech užito lyzátů transformovaných minibuněk. K tomuto účelu jsou vhodné kmeny *Escherichia coli* X1776 a P678-54, které produkují minibuňky.

Na obr. 7 jsou znázorněny elektroforetické pásy, získané při použití minibuněk X1776. Pás (a) byl získán z netransformovaných buněk X1776. Pás (b) byl získán z buněk X1776, transformovaných pBR322. Pás (c) byl získán z buněk X1776 transformovaných pTS-1 a pás (d) z buněk X1776 transformovaných pLRI-2. Pás β -galaktosidázy, označený číslem 2 je možno pozorovat v buňkách, transformovaných pTS-1, kdežto další pás označený 1, je možno pozorovat po působení pLRI-2. V pokusu bylo užito akrylamidového gelu o koncentraci 18 % (hmotnostní/objemová %). Další dělení bylo prováděno ještě při použití gelů o koncentraci 6 % (hmotnostní/objemová %).

Na obr. 8 je znázorněn výsledek částečného čištění lyzátů buněk *Escherichia coli*, které byly transformovány DG-75. Buňky byly pěstovány do optimální hustoty nižší než 1,0 při 650 nm při délce 1 cm, odděleny odstředěním a zmrazeny. Zmrazené buňky byly mlety při teplotě 0 °C v předem stanoveném hliníkovém zařízení, bylo užito 7 g buněk v 1 litru kultury za přítomnosti fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF), který inhibuje proteolytické enzymy. Rozrušené buňky z 1 litru kultury byly uvedeny v suspenzi ve 100 ml 0,02 M Tris o pH 7,5, 0,01 M MgCl₂, 0,1 M NaCl a 1 ml PMSF o koncentraci 1 % (hmotnostní/objemová %) v dimethylsulfoxidu. Pak byl přidán síran amonný do konečné koncentrace 33 % (hmotnostní/objemová %). Vysrážená bílkovina se odstředí a dialyzuje proti 40 mmolům Tris o pH 8,0, 1 mmol EDTA, 1 mM MgCl₂ a 5 mM β-merkaptoethanolu. DG-75 obsahuje chromozomální gen pro β-galaktosidázu. Tato β-galaktosidáza však v blízkosti N-terminálního zakončení není úplná a je proto inaktivní. Naproti tomu po transformaci pLRI-2 se získá účinný enzym, protože pravděpodobně dojde k doplnění struktury. V tomto případě může být β-galaktosidáza, která je tetramerem účinná i ve formě smíšeného tetrameru, který sestává z jednotlivých neaktivních složek. Při elektroforéze na gelu dochází k disociaci tetrameru. Pásky (a) a (j) byly získány při použití běžně dodávané galaktosidázy (Boehringer-Mannheim Corp., New York, N. Y.), tak jak je označeno šipkami. Pás (d) byl získán z bílkoviny, kterou bylo možno vysrážet působením 3,3% síranu amonného (hmotnostní/objemová %). Částečně čištěná bílkovina byla frakcionována chromatografií na přípravku DEAE-BioGel, (BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornie). β-galaktosidáza byla vázána na sloupec při použití 40 mmolů Tris o pH 8,0, 1 mmol EDTA, 1 mmol MgCl₂, 5 mmolů β-merkaptoethanolu, avšak většina chimérické bílkoviny, sestávající z galaktosidázy a preproinsulinu vázána nebyla. Bílkoviny, které nebyly při této reakci vázány byly znovu podrobeny chromatografii na gelu (b) a (c). Tyto sloupce byly vymývány při použití lineárního gradientu chloridu sodného. Byla stanovena účinnost β-galaktosidázy a frakce, které byly získány v blízkosti nejvyšší účinnosti byly analyzovány v pásech (e až i). Vrchol účinnosti byl spojen s pásem (g). Jak bylo možno očekávat, tento vrchol sestával z větší části z normální β-galaktosidázy, avšak obsahoval malé množství chimérické β-galaktosidázy s proinzulínem, jak bylo usuzováno z hustoty pásu.

Na obr. 9 je znázorněn výsledek elektroforézy na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 18 % (hmotnostní/objemová %) při použití bílkovin z nefrakcionovaného lyzátu jediné kolonie *Escherichia coli* CSH20. Kmen CSH20 byl popsán ve svrhu uvedené publikaci Miller J. a další. V kmeni CSH20 dochá-

zí k velkému poškození chromozomálního genu pro β-galaktosidázu. V důsledku toho buňka neprodukuje žádnou bílkovinu tohoto rozměru, leda že by do ní byl včleněn plazmid s obsahem uvedeného genu. Kultura kmene CSH20 transformovaného pLRI-2 byla nanášena na plotny XGal s obsahem ampicilinu. Bylo možno pozorovat bílé i modré kolonie. V dráze 28 je možno vidět spektrum bílkovin pro bílou kolonii, v dráze 29 spektrum pro modrou kolonii. Zatímco v dráze 29 je možno jasně pozorovat pás pro chimérickou bílkovinu u šipky 1, v dráze 28 kolonie zřejmě neměla schopnost produkovat chimérickou bílkovinu. Tento rozdíl v expresi plazmidu zatím není vysvětlen. Obdobné chování je možno pozorovat i u buněk, které byly transformovány pTS1. V dráhách 30 a 31 jsou uvedena spektra pro bílou a modrou kolonii. Je tedy možno provést výběr podle syntézy požadovaných bílkovin za určitých růstových podmínek, přestože mechanismus není znám. V dráze 32 je znázorněno spektrum lyzátu *Escherichia coli* CSH17 (Miller J.), u něhož dochází pouze k malému poškození β-galaktosidázy. V dráze A je uvedena čištěná β-galaktosidáza jako kontrola.

Údaje, uvedené na obr. 7 až 9 tedy prokazují syntézu chimérické bílkoviny, která obsahuje část sledu pro β-galaktosidázu a proinzulínový sled. Tento závěr byl potvrzen analýzou nukleotidového sledu kombinovaného genu v pLRI-2. Sled nukleotidů odpovídal kódu pro očekávanou chimérickou bílkovinu.

Na obr. 10 je znázorněna elektroforéza na gelu při použití bílkoviny, produkované minibuňkami *Escherichia coli* P678—54, které byly transformovány pExRGH nebo pBR322. Bílkovina po transformaci pBR322 je znázorněna v dráze A. Tmavý pás při šipce 2 je β-laktamáza, jak je možno zjistit při srovnání s kontrolní dráhou C, v níž je uvedena extracelulárně vyloučená β-laktamáza. V páse B je uvedeno spektrum pro pExRGH. Je zřejmé, že β-laktamáza není přítomna, zato je šipkou 1 znázorněn nový pás s molekulovou hmotností 47 000. Vypočítaná molekulární hmotnost chimérické bílkoviny byla 44 300, takže naměřená hodnota je v rozmezí 10% chyby užitých metod.

Příklad 3

Na obr. 11 jsou znázorněny výsledky radioimunologického sledování kolonií transformovaných pECRGH nebo pBR322. Tímto způsobem uvedeným v příkladu 1H jsou kolonie transformovaných bakterií částečně rozrušeny působením chloroformových par, pak převrstveny filmem z plastické hmoty s antisérem proti růstovému hormonu, pak se tento film vystaví působení (¹²⁵I)-proti-látky proti růstovému hormonu, která se může vázat, jak je to v imunochemii obvyklé na místa, obsazená růstovým hormonem

nebo imunologicky příbuznou chiméřní bílkovinu. Po promytí se pak film exponuje na autoradiografické desce. Jak je zřejmé z obr. 11, všechny kolonie transformované pExRGH byly pozitivní, pokud jde o produkci růstového hormonu, kdežto kolonie, transformované pBR322 byly negativní.

Citlivost této metody je prokázána na obr. 12. Byly pěstovány kolonie bakterií, které obsahují plazmid pEcRGH nebo pBR322 nebo neobsahovaly žádný plazmid. V levém sloupci jsou uvedeny výsledky svrchu uvedených zkoušek. V případě, že byl přidán přebytek neznačeného růstového hormonu, došlo k úplné vazbě (^{125}I)-protilátky, takže nedošlo k vazbě na kolonie. Při druhém kontrolním pokusu bylo užito normální neimunní opičí sérum místo protilátky proti růstovému hormonu. V pravém sloupci jsou uvedena množství RGH, jichž bylo zapotřebí ke stanovení hranic citlivosti. Přestože bylo možno opakovaně dosáhnout pozitivního výsledku při koncentraci 8 ng, nebylo možno při nižších koncentracích dosáhnout žádný

výsledek. Příčina této náhlé ztráty citlivosti není známa.

Imunologický test byl užit také k potvrzení totožnosti chiméřní bílkoviny, sestávající z β -galaktosidázy a inzulinu a znázorněné na obr. 7 až 9. Na bílkoviny, izolované elektroforézou na gelu se nejprve působí bromkyanem a pak se nanesou na gel, určený k provádění zkoušek. Výsledky jsou uvedeny na obr. 13. V dráze A je možno prokázat velkou bílkovinu, která byla identifikována jako spojení β -galaktosidázy a inzulinu. V dráze B se nachází samotná β -galaktosidáza a v dráze C samotný inzulin. Výsledek ukazuje, že chiméřní bílkovina obsahuje inzulinový sled, a že inzulinový sled reaguje po působení bromkyanem s protilátkou proti inzulinu. Mimoto byla křivka citlivosti normální, to znamená, že nedošlo k náhlému přerušení.

Přestože způsob podle vynálezu byl popsán v souvislosti se specifickými provedeními, je zřejmé, že jde o obecný způsob, který dovoluje celou řadu modifikací, které rovněž spadají do oboru vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob syntézy eukaryotické bílkoviny při použití mikroorganismu, při němž se mikroorganismus transformuje vektorem pro přenos DNA, sestávajícím z bakteriálního genu s včleněným sledem nukleotidů, který je kódem pro eukaryotickou bílkovinu s následným pěstováním mikroorganismu za podmínek, dovolujících expresi bakteriálního genu, vyznačující se tím, že včleněný sled sestává z cDNA, která je kódem alespoň pro část eukaryotické bílkoviny, vektor pro přenos DNA sestává z bakteriálního genu, obsahujícího alespoň oblast, řídící počátek transkripce a počátek translace a včleněný sled je uložen vzhledem k bakteriálnímu genu tak, že jakmile dojde k počátku transkripce a translace při pěstování transformovaného mikroorganismu za podmínek, dovolujících expresi bakteriálního genu, dochází také k transkripci a translaci uvedeného sledu, takže transformovaný mikroorganismus syntetizuje eukaryotickou bílkovinu nebo chiméřní bílkovinu, která obsahuje eukaryotickou bílkovinu jako terminální sled aminokyselin na zakončení, na němž se nachází karboxylová skupina.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím,

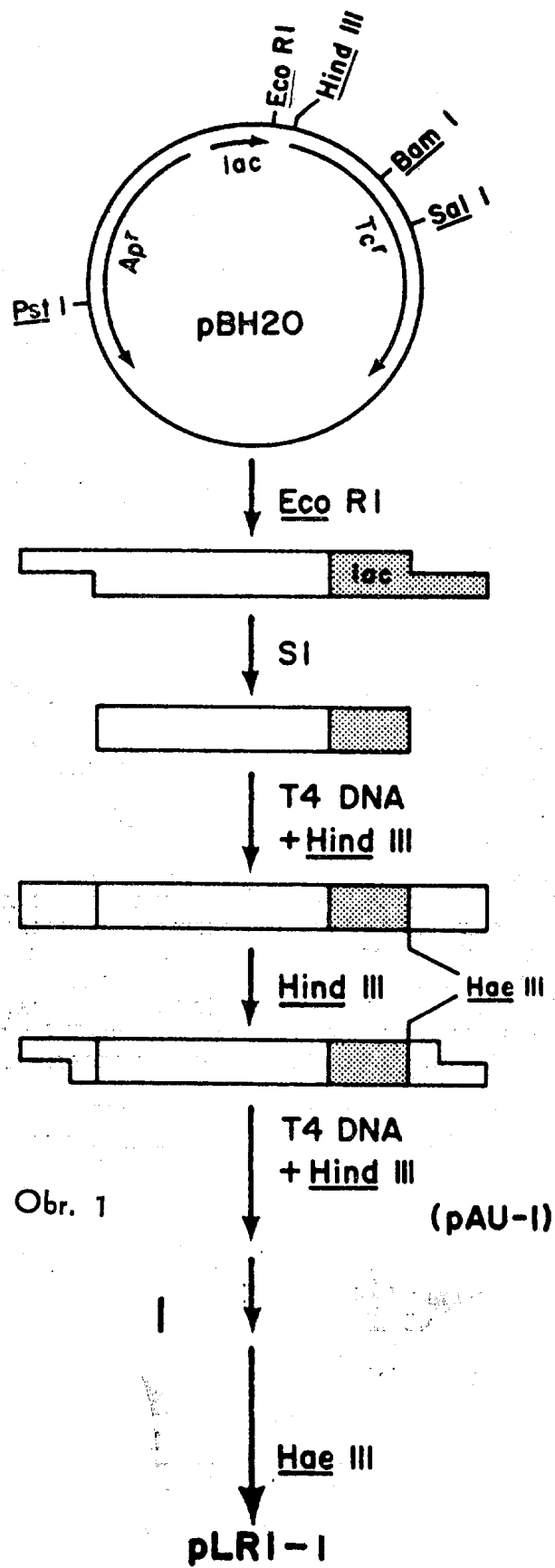
že se jako mikroorganismu užije *Escherichia coli*, bakteriální gen obsahuje část strukturálního genu *Escherichia coli* pro beta-galaktosidázu a eukaryotickou bílkovinou je inzulin.

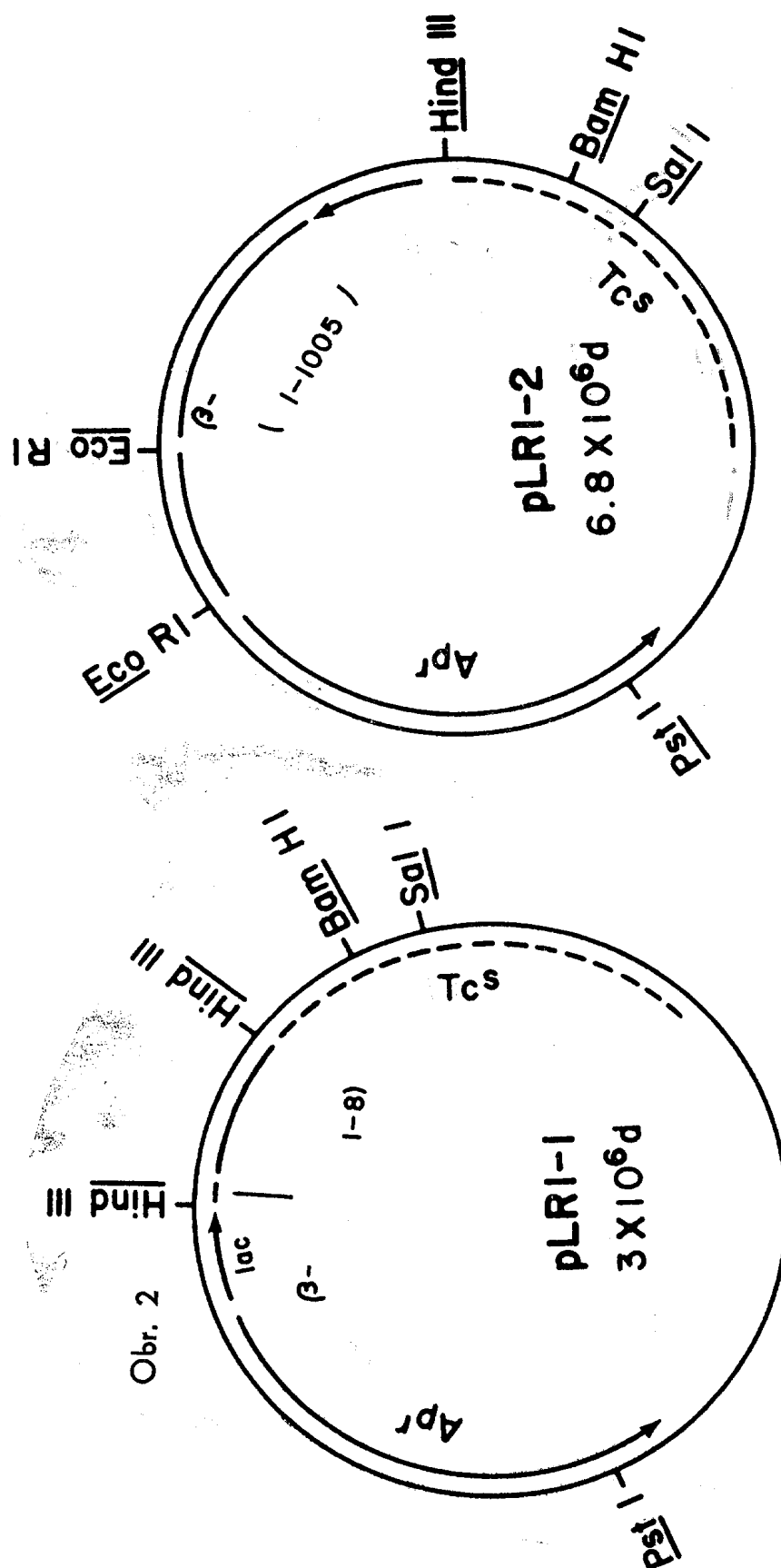
3. Způsob podle bodů 1 a 2 vyznačující se tím, že včleněným sledem je klonovaný fragment cDNA, označovaný jako pAU-1 a jako vektoru pro přenos DNA, užitého k transformaci mikroorganismu se použije pLRI-1.

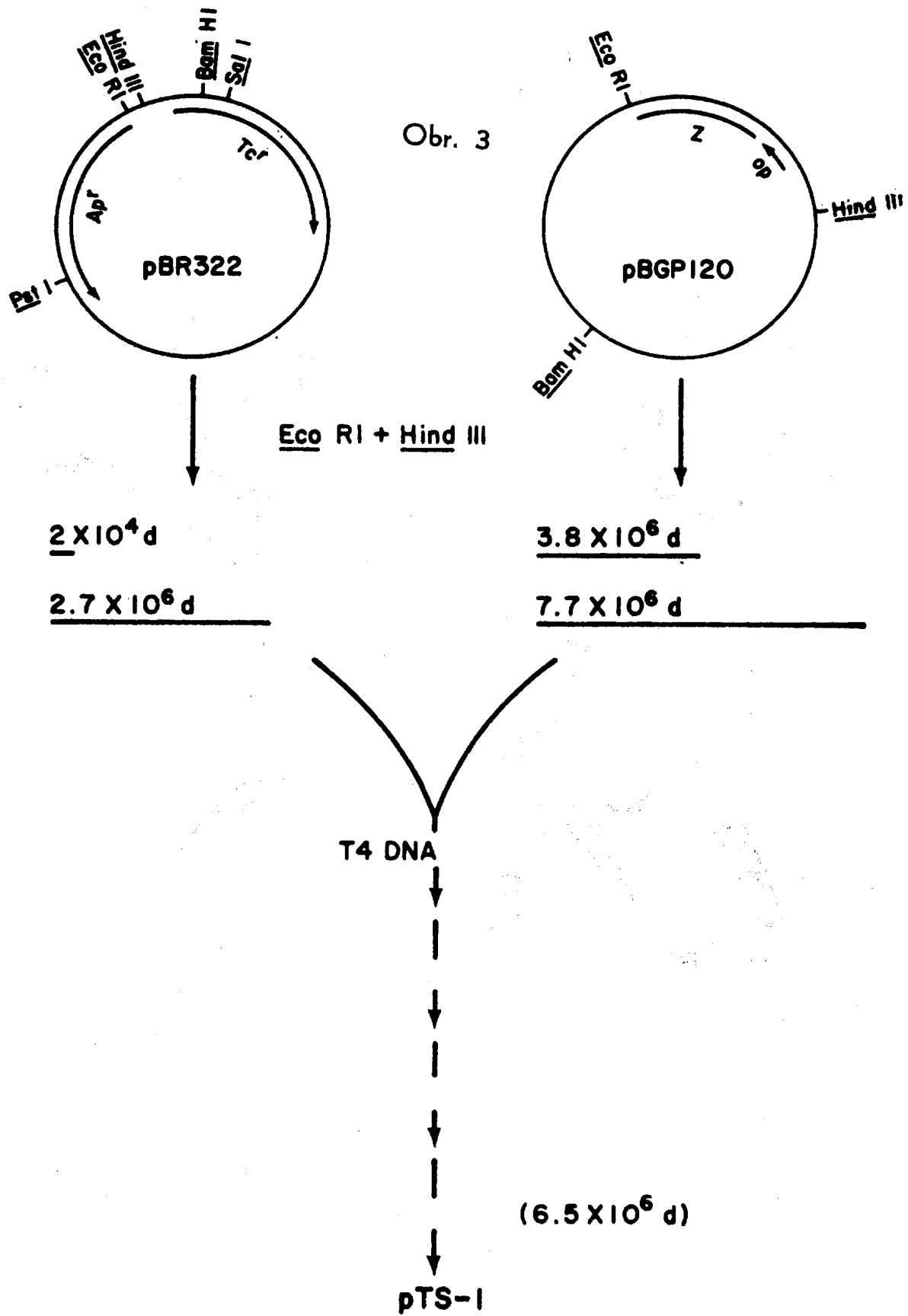
4. Způsob podle bodů 1 a 2 vyznačující se tím, že včleněný sled se vytvoří kombinací klonovaných fragmentů cDNA, označených pAU-1 a pAU-2 na společném místě pro štěpení enzymem *AluI* a vektorem pro přenos DNA, užítým k transformaci mikroorganismu je pLRI-2.

5. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se jako mikroorganismu užije *Escherichia coli*, bakteriální gen obsahuje část strukturálního genu *Escherichia coli* pro beta-laktamázu a eukaryotickou bílkovinou je růstový hormon.

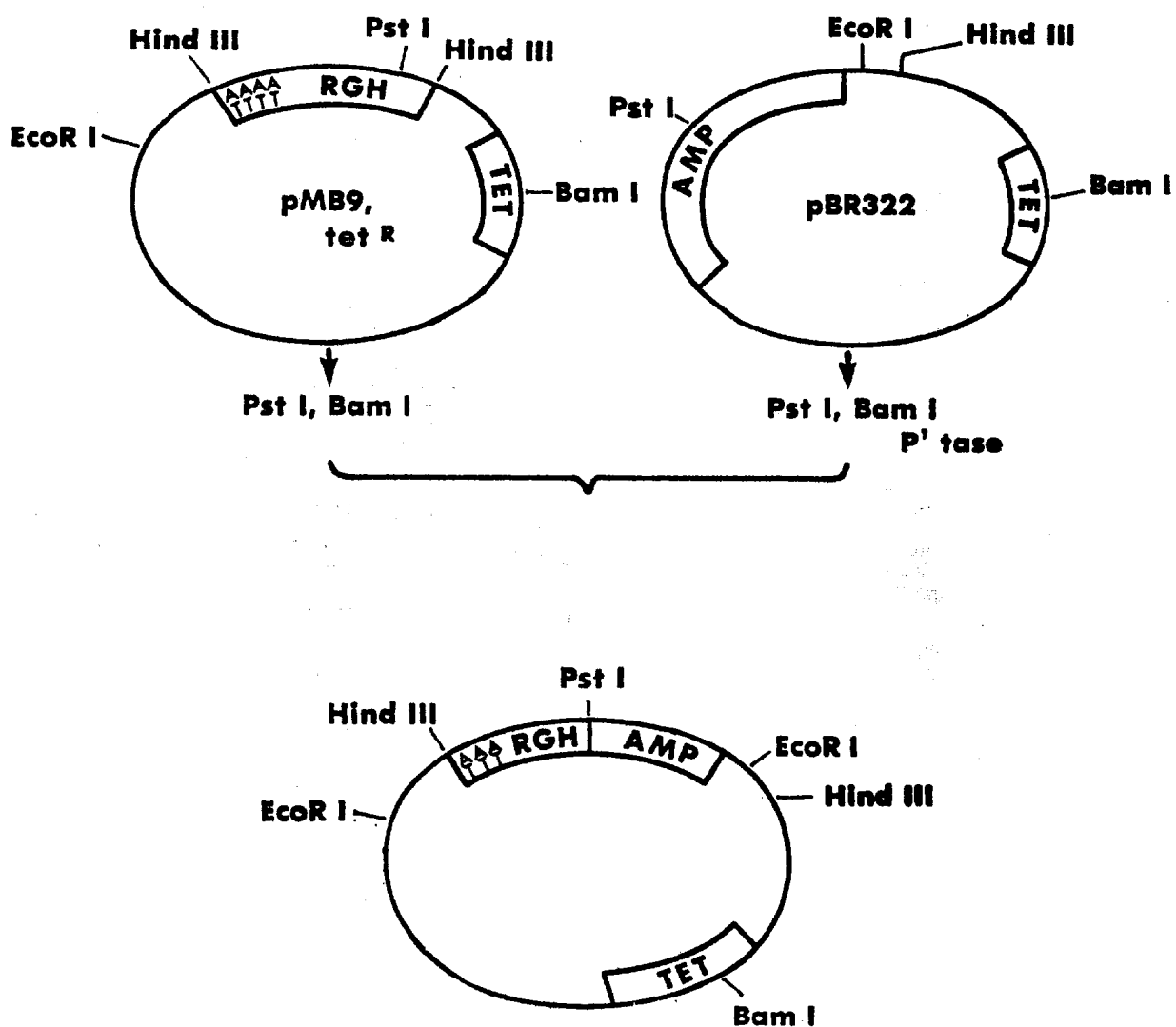
6. Způsob podle bodů 1 a 5 vyznačující se tím, že vektorem, užítým pro přenos DNA při transformaci mikroorganismu je pExRGH.



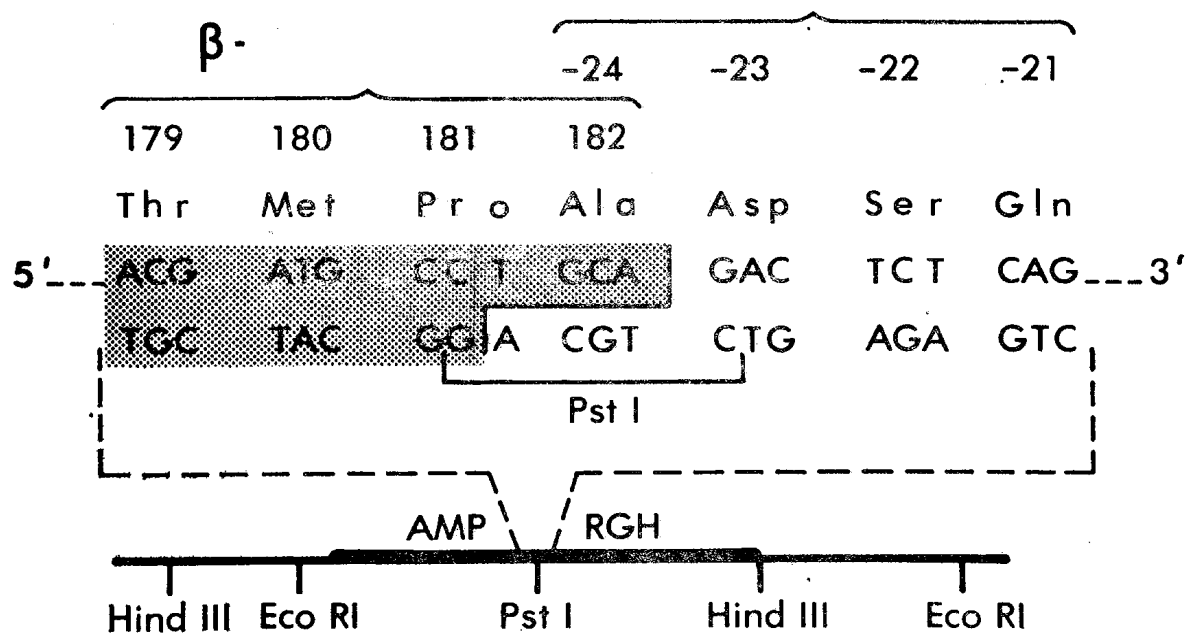


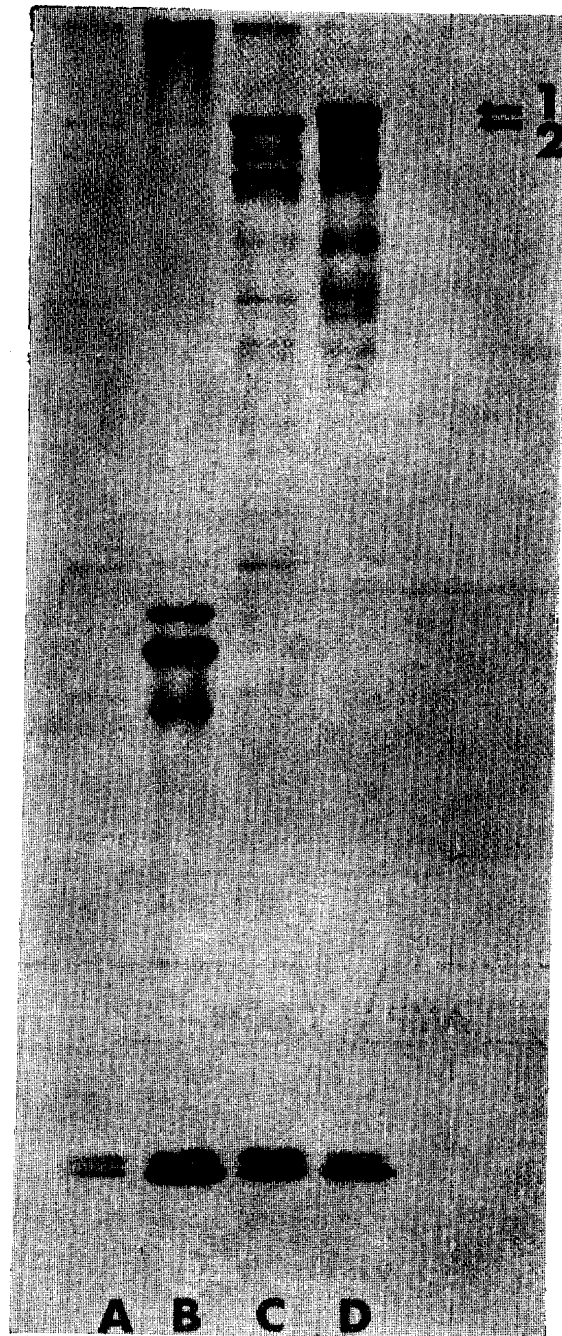


Obr. 5

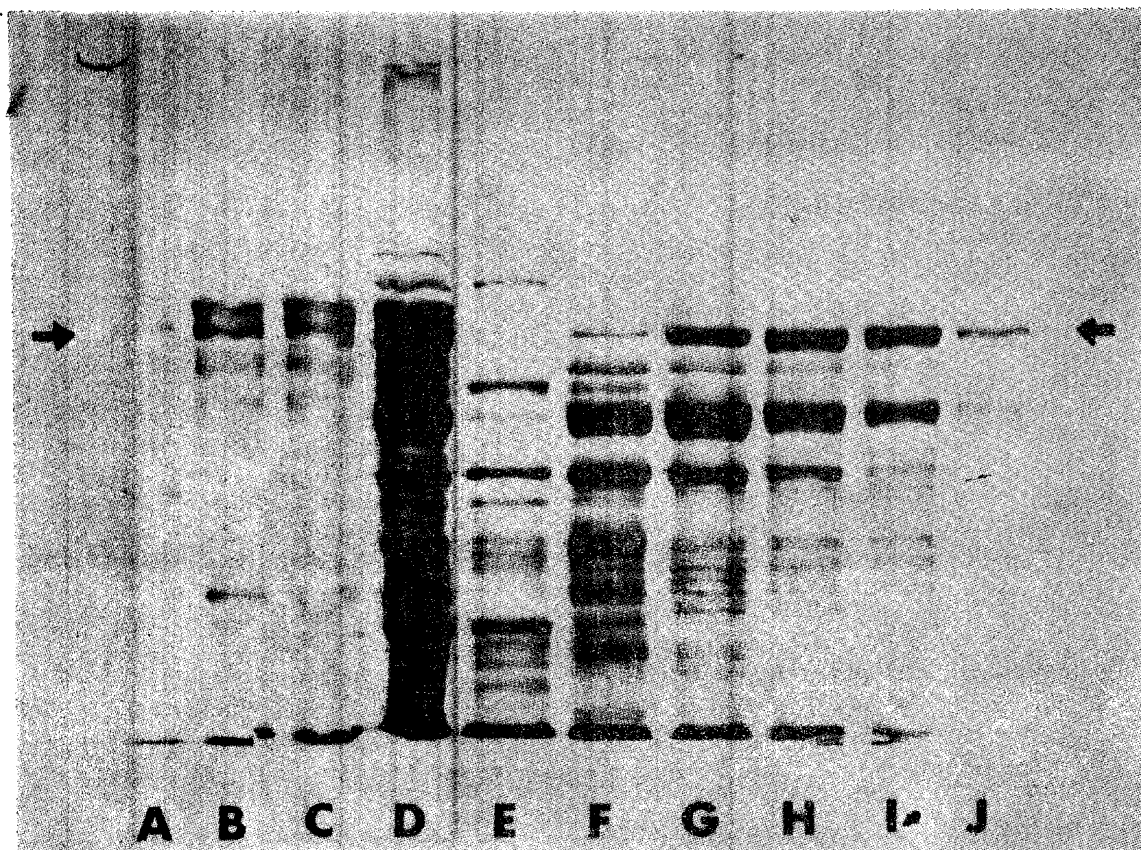


Obr. 6

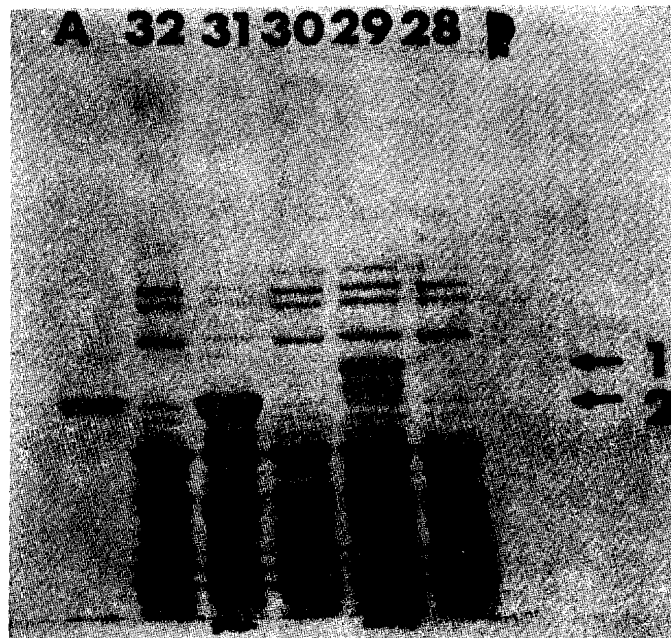




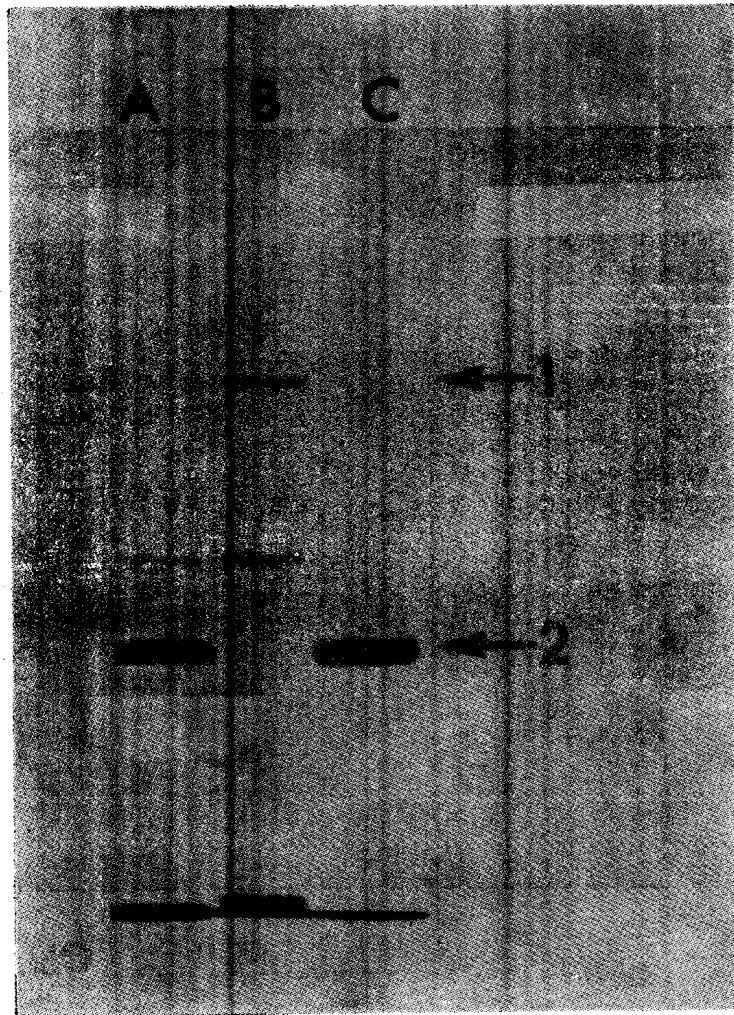
Obr. 7



Obr. 8

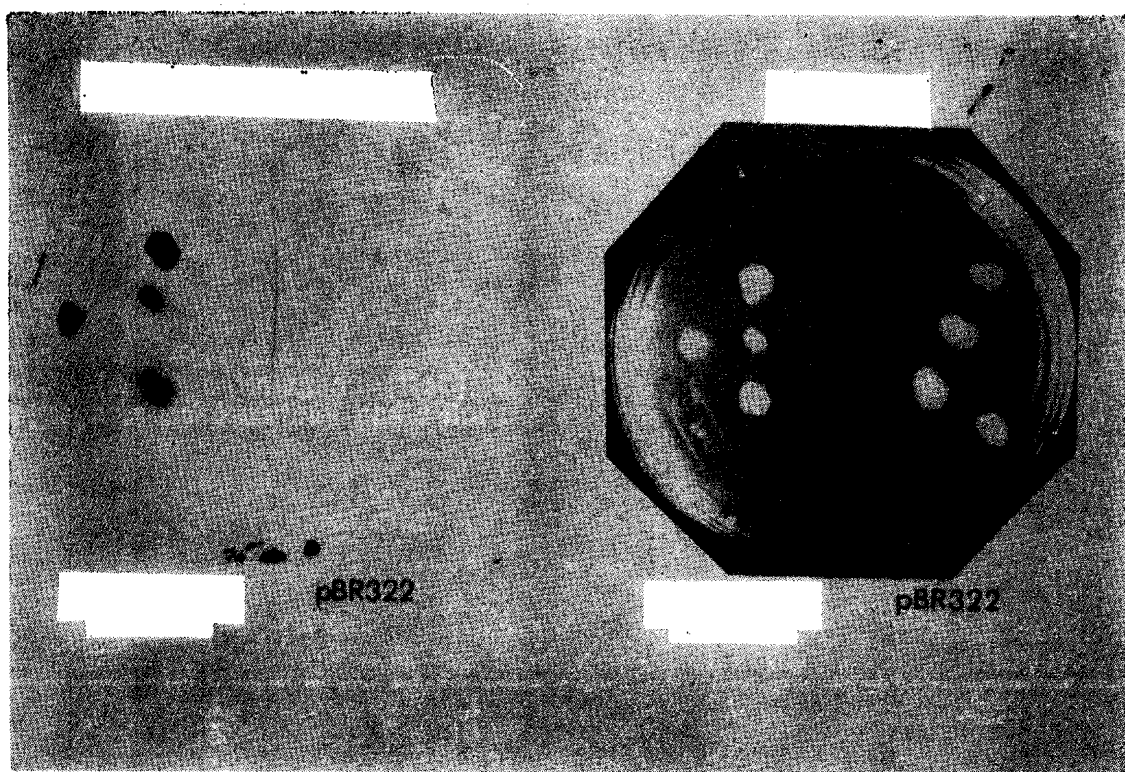


Obr. 9

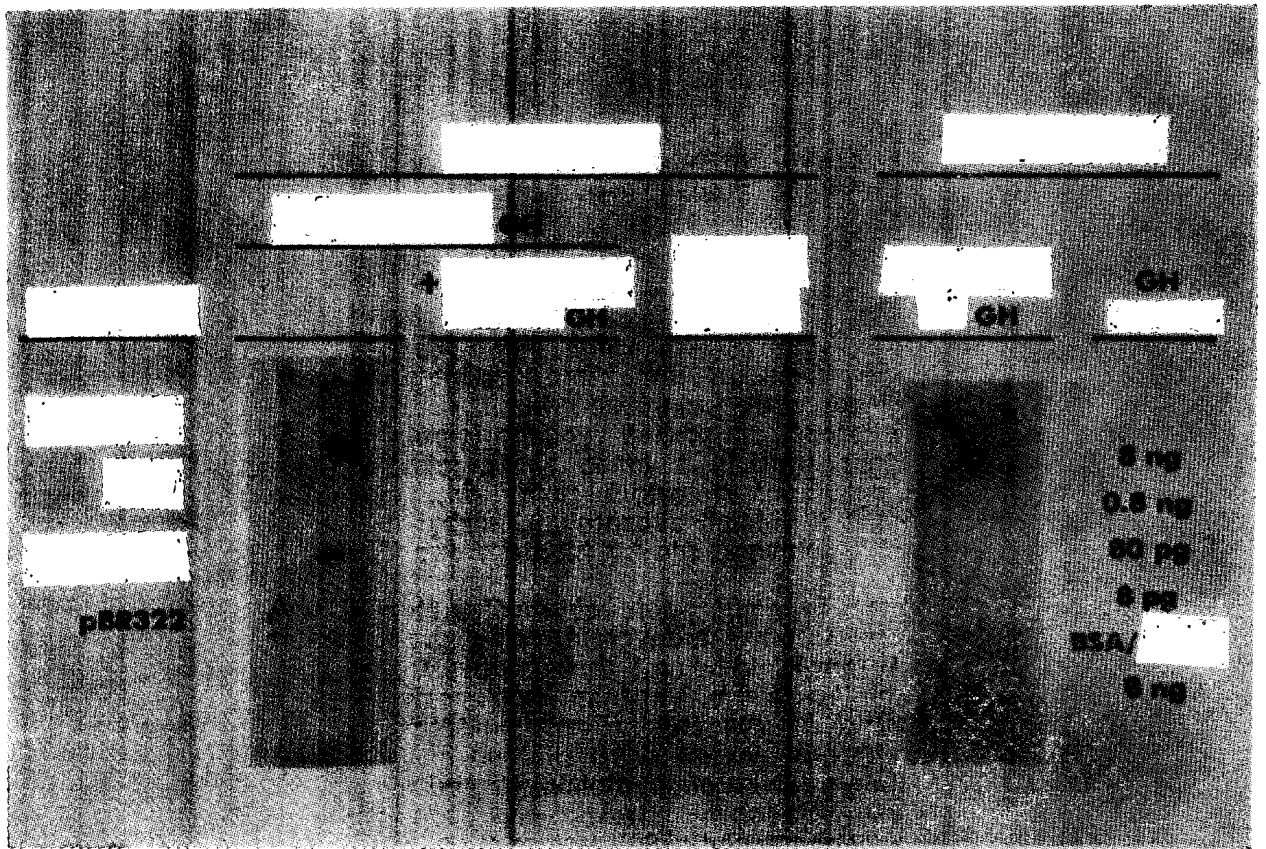


Obr. 10

219257



Obr. 11



Obr. 12



Obr. 13