

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

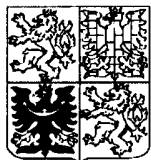
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1601-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22. 05. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.05.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/97108433**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/00
C 12 N	15/62
C 07 K	14/47
C 07 K	16/18
A 01 K	67/027
C 12 G	1/68

(71) Přihlášovatel:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Kirschbaum Bernd dr., Mainz, DE;
Berglund Erick dr., Wiesbaden, DE;
Meisterernst Michael dr., Eichenau, DE;
Polites Greg dr., Bridgewater, NJ, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

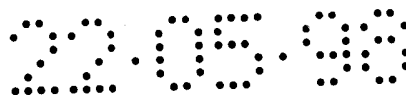
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Transgenní zvíře, transgen, způsob
jejich přípravy a použití pro purifikaci
transkripčních komplexů**

(57) Anotace:

Vynález se týká transgenů obsahujících DNA, která kóduje protein s epitopovou značkou, vázající se na box TATA /TBP/, vytvoření transgenních zvířat, která exprimují TBP s epitopovou značkou a jeho použití pro afinitní purifikaci /nových/ transkripčních faktorů a transkripčních komplexů z celé řady eukaryotických tkání a buněčných typů.

CZ 1601-98 A3



PV 1601-98

~~31523~~

176 008/KB

1

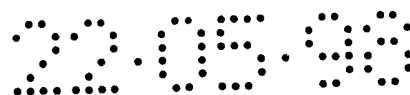
Transgenní zvíře, transgen, způsob jejich přípravy a použití pro purifikaci transkripčních komplexů

Oblast techniky

Vynález se týká transgenu, který obsahuje DNA kódující protein vázající box TATA (TBP) se značeným epitopem, vytvoření transgenních zvířat, která exprimují TBP se značeným epitopem a jeho použití pro afinitní purifikaci (nových) transkripčních faktorů a transkripčních komplexů z celé řady eukaryotických tkání a buněčných typů.

Dosavadní stav techniky

Postupná formace a aktivita pre-iniciačního komplexu je nejdůležitějším faktorem pro regulaci eukaryotické transkripce. Pre-iniciační komplex je rozsáhlý komplex s mnoha podjednotkami, který je nezbytný pro správné umístění a iniciaci enzymu RNA polymerázy II v místě počátku transkripce. V posledních letech bylo charakterizováno mnoho obecných transkripčních faktorů (GTF) tohoto komplexu z eukaryotických jader, včetně TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF a TFIIH (Zawel a Reinberg, 1995, Ann. Rev. Biochem., 64, 533-561, Serizawa et al., 1994, In: Transcription: Mechanisms and regulation, 45-66, Raven press). V promotorech obsahujících TATA (sekvenci) má TFIID specifickou afinitu pro sekvenci boxu TATA. Prostřednictvím rozpoznání této sekvence je způsobeno, že TFIID je první prvek, který se váže k promotoru v základní transkripci RNA polymerázou II, a tím tvoří nukleační komplex (Lewin, B., 1990, Cell, 61, 1161-1164). Další GTF se vážou postupně



vymezeným způsobem, což vede ke vzniku kompletního pre-iniciačního komplexu. Tento velký komplex následně vyhledá a správně umístí RNA polymerázu II (Pol II) na místo počátku transkripce, aby inicioval bazální transkripci. Je jasné, že TFIID, sám o sobě komplex s mnoha podjednotkami, hraje klíčovou úlohu v regulaci „aktivované transkripce“, volně definované jako zvýšené hladiny produkce mRNA v přítomnosti transkripčních aktivátorů. Tyto aktivátory mohou být přirozeně se vyskytující determinanty vázající zesilovač, jako je box E vázající USF (Sawadogo a Roeder, 1985, Cell, 43, 165-175, Kirschbaum et al., 1992, Mol. Cell. Biol., 12, 5094-5100) nebo virové faktory jako je VP16 (Stringer et al., 1990, Nature, 345, 783-786).

TFIID je složen z proteinu vázajícího se na box TATA (TBP) a několika faktory sdruženými s TBP (TAF_{II}s) (v přihlášce termín „TAF_{II}s“ zahrnuje jakýkoliv druh transkripčního faktoru, transkripčního aktivátoru, transkripčního inhibitoru). Do současnosti bylo charakterizováno až 20 odlišných TAF_{II}s a byly pozorovány komplexy TFIID obsahující různé kombinace TAF_{II}s (Zawel a Reinberg, 1995, Ann. Rev. Biochem., 64, 533-561, Hori, R., a Carey, M., 1994, Curr. Opinion Gen. Dev., 4, 236-244). Kromě toho různé kombinace TAF_{II}s propůjčují komplexu TFIID rozdílné vlastnosti. Například u drozofil jsou proteiny tvořící vzor Hunchback (HB) a Bicoid (BCD) zcela odkázané na přítomnost TAF_{II}60, TAF_{II}110 a TAF_{II}250 v komplexu TFIID (Sauer, F., et al., 1995, Science, 270, 1783-1788). Tyto složky TFIID působí jako společné aktivátory pro protisměrné k zesilovači vázané proteiny HB a BCD. Bylo prokázáno, že neurogenní faktor NTF-1 vyžaduje pro aktivovanou transkripci minimální komplex TBP, TAF_{II}150 (ke kterému se váže) a TAF_{II}250, zatímco SP1 vyžaduje pro svou aktivaci další faktor

TAF_{II}110 (Chen, J-L., et al., 1994, Cell, 79, 93-105). Další studie identifikovala TAF_{II}28, jehož přítomnost je nezbytná pro transkripční aktivaci estrogenových receptorů a jaderných receptorů pro vitamin D3 (May, M., et al., 1996, EMBO, 15, 3093-3104). Je pravděpodobné, že TAF_{II}s působí jako transkripční adaptéry přenášející regulační informaci od aktivátorových/receptorových faktorů k jádru iniciačního komplexu prostřednictvím interakcí protein-protein.

Podle současného pohledu na regulovanou transkripci, exprese jednotlivých genů a/nebo malých skupin blízce příbuzných lokusů je regulována definovatelnými soubory podjednotek transkripčního komplexu. Ačkoliv některé z faktorů jsou všudypřítomné a přítomné ve většině transkripčních jevů, například GTFs, byl nyní popsán zvyšující se počet genově a buněčně specifických prvků regulované transkripce.

Existuje několik ověřených metod, které byly použity pro identifikaci transkripčních faktorů. Dřívější strategie, které vedly k objevu RNA Pol II a sedmi různých GTF (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH a TFIIJ), vyžadovaly hlavně frakcionaci jaderných preparátů z buněčných linií na kolonách (Zawel a Reinberg, 1995, Serizawa et al., 1994, Roeder, R.G., 1996, TIBS, 21, 327-335). Tyto frakce poskytovaly částečně purifikované proteiny s různým množstvím transkripční schopnosti. Většina těchto frakcí se zdála být zcela nezbytná pro bazální transkripci. V této době bylo známo, že frakce TFIID byla zodpovědná za rozpoznávání boxu TATA. Avšak pokusy izolovat jeden protein se schopností vázat se na TATA nebyly úspěšné. Průlom nastal, když se ukázalo, že jedna složka z kvasinek je schopná nahradit TFIID v testech rekonstituované bazální transkripce, což vedlo k izolaci a klonování proteinu

vázajícího se na TATA (TBP) o velikosti 27 kD (Buratowski, S., et al., 1988, *Nature*, 334, 37-42, Cavallini, B., et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 9803-9809). Použití degenerovaných primerů vedlo k další identifikaci genů pro podjednotku TBP lidského (Kao, C.C., et al., 1990, *Science*, 248, 1646-1649, Hoffmann, A., et al., 1990, *Nature*, 346, 387-390, Peterson, M.G., et al., 1990, *Science*, 248, 1625-1630), drozofily (Hoey, T., et al., 1990, *Cell*, 61, 1179-1186, Muhich, M.L., et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 9148-9152) a myšního TFIID (Tamura, T., et al., 1991, *Nuc. Acids Res.*, 19, 3861-3865).

Dostupnost cDNA pro TBP z různých druhů umožnila široký rozvoj výzkumu včetně nadměrné exprese (over-expression) těchto proteinů v buněčné kultuře. Byly vytvořeny linie buněk HeLa, které konstitutivně exprimují protein TBP se značkou FLAG nebo s označením epitopu hemaglutininem (HA) viru chřipky, který je přidán k jeho amino konci (Zhou, Q., et al., 1993, *Genes & Development*, 7, 180-187, Chiang et al., 1993, *EMBO*, 12, 2749-2762). Značka FLAG je epitop skládající se ze syntetické sekvence osmi aminokyselin. Značka HA je přirozený epitop s aminokyselinovou sekvencí s identifikačním číslem 1 „MGYPYDVPDYAV“ (jednopísmenný kód).

Pro expresi fúzního proteinu obsahujícího TBP v drozofilové buněčné linii byl také použit kratší peptid z přirozené značky HA (10 aminokyselin z hemaglutininu viru chřipky) (Colgan a Manley, 1992, *Genes Dev.*, 6, 304-331, Trivrdi et al., 1996, *Mol. Cel. Biol.*, 16, 6909-6916).

Proteiny TBP se dvěma epitopy značenými na amino koncích, epitop FLAG a HA, byly exprimovány v bakteriích (Chiang et al., 1993, *EMBO*, 12, 2749-2762). Proteiny TBP značené FLAG byly také exprimovány za regulace

indukovatelným promotorem (Wu et al., 1996, BioTechniques, 21, 718-725). Byly použity monoklonální protilátky proti epitopu/epitopům, aby se purifikovaly komplexy sdružené s TBP z jaderných extraktů, šlo tedy o společnou purifikaci faktorů sdružených s TBP v komplexu TFIID (TAF_{II}s) (Zhou, et al., 1993, Genes Dev., 7, 180-187).

V mnoha laboratořích pokračuje v tomto směru výzkum vedoucí k současné vlně nových TAF a faktorů interagujících s TAF, které jsou identifikovány a charakterizovány z jaderných extraktů buněk HeLa a kvasinek (Hori, a Carey, 1994, Curr. Op. Gen. Dev., 4, 236-244, Zawel a Reinberg, 1995, Ann. Rev. Biochem., 64, 533-561, Roeder, R.G., 1996, Trends Biochem. Sci, 21, 327-335).

Z lidských TAFs jsou známy TAF_{II}68, TAF_{II}55, TAF_{II}30, TAF_{II}28, TAF_{II}20 a TAF_{II}18 (Mengus et al., 1995, EMBO, 14, 1520-1531, Bertolotti et al., 1996, EMBO, 15, 5022-5031, Wu a Chiang, 1996, Biotechniques, 21, 718-725).

Je třeba zdůraznit, že ačkoliv byla těmito metodami nalezena hojnost faktorů, výzkum je omezen na transkripční komplexy, TAFs a faktory interagující s TAF, které jsou specifické pro typ buněčné linie nebo kmen kvasinek, který je používán.

Podstata vynálezu

Vynález se týká „univerzálního systému“, kde je TBP se značeným epitopem použit pro afinitní purifikaci nových transkripčních komplexů a transkripčních faktorů, TAFs a faktorů interagujících s TAF, v souvislosti s celým zvířetem, a tudíž z celé řady odlišných eukaryotických tkání a buněčných typů.

Vynález se týká transgenního zvířete kromě člověka, které je schopné exprimovat protein vázající se na box TATA (TBP) se značeným epitopem. V dalším ohledu se vynález týká použití transgenního zvířete kromě člověka výhodně pro identifikaci a izolaci transkripčních komplexů vyššího řádu a pro identifikaci a izolaci proteinů sdružených v transkripčním komplexu vyššího řádu (TAFs a faktory interagující s TAF, např. transkripční faktory). V dalším ohledu se vynález týká přípravy transgenního zvířete kromě člověka zavedením transgenů (gen jiný než přirozeně se vyskytující) do zárodečné linie a/nebo somatických buněk transgenního zvířete kromě člověka, výhodně v konkrétním stupni vývoje. Vynález se dále týká transgenů, který může být použit pro tvoření transgenních zvířat kromě člověka.

Provedení vynálezu tedy poskytuje transgen, který kóduje TBP se značeným epitopem. Transgen výhodně obsahuje první sekvenci DNA, která kóduje jednu nebo více epitopových značek, a dále obsahuje druhou sekvenci DNA, která kóduje TBP. Transgen může obsahovat další sekvenci(e) DNA, která kóduje epitopovou značku(y). DNA, která kóduje TBP, je výhodně cDNA. DNA, která kóduje TBP, může být jakákoliv přirozeně se vyskytující DNA, její derivát nebo část. DNA, výhodně cDNA, může být např. z eukaryot, včetně ptáků, obojživelníků, plazů, kvasinek, *C. elegans*, savců, apod. Může být použita například DNA kódující TBP z hlodavců, ovce, psa, krávy, prasete a primátů, člověka nebo jejich části. Výhodné je použití lidské cDNA pro TBP (hTBP). Vynález také zahrnuje použití jakékoliv DNA, která se nevyskytuje přirozeně, např. derivát TBP-cDNA. Derivát DNA může mít například změněnou sekvenci, např. mutovanou nebo modifikovanou sekvenci a/nebo může obsahovat modifikované

„GYPYDVDPDYA“ (sekvence s identifikačním číslem 3), „YPYDVDPDYA“ (sekvence s identifikačním číslem 4) nebo další peptidy pocházející z epitopu HA.

V jednom provedení vynálezu obsahuje transgen cDNA lidského TBP a dvě sekvence DNA, které kódují epitopovou značku. Výhodně první sekvence DNA kóduje epitop HA, který může sloužit jako epitop pro imunoreakci např. s komerčně dostupnou monoklonální protilátkou (Kolodziej a Young, 1991, Meth. Enzym., 194, 508-519). Přimo na 3' konci k sekvenci, která kóduje značku HA, je lokalizována sekvence DNA, která kóduje úsek 6 histidinových zbytků (značka His). Značka His může tvořit nekovalentní reverzibilní komplex s ionty Ni^{2+} . Například komerčně dostupný Ni^{2+} agarózový materiál pro afinitní kolony je rutinně používán k purifikaci proteinů značených His (Hochuli, E., et al., 1987, J. Chromatography, 411, 177-184, Janknecht, R., et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 4835). Ve speciálním provedení vynálezu transgen obsahuje sekvenci DNA s identifikačním číslem 13. Sekvence s identifikačním číslem 13 poskytuje transgen, který kóduje fúzní protein skládající se z dvojité značeného hTBP.

Ve výhodném provedení vynález poskytuje transgen, který kóduje TBP se značeným epitopem a který obsahuje promotor pro expresi fúzního proteinu. Transgen může obsahovat jednu nebo více genově regulačních sekvencí kromě DNA, která kóduje TBP (např. cDNA z TBP nebo její derivát) a sekvenci(e) DNA kódující epitopové značky. Tyto genově regulační sekvence jsou například přirozené nebo syntetické promotory nebo jejich části a/nebo cis působící prvky (např. zesilovač-enhancer, tlumič-silencer). Pro tento účel mohou být použity savčí promotory, například promotor myšího transferinového genu, promotor genu enolázy specifické pro neurony (NSE) (Fors-Petter, S., et al., 1990, Neuron, 5,

187-197) nebo promotor thymidinkinázového genu. Mohou být také použity virové promotory, jako například promotory genů cytomegaloviru nebo časného genu SV40. Výhodně se použijí indukovatelné nebo konstitutivní promotory nebo jejich deriváty. Jako konstitutivní promotor může být použit například promotor genu lidského elongačního faktoru-1 alfa (EF) (Uetsuki, T., et al., 1989, J. Biol. Chem., 264, 5791-5798). Jako indukovatelný promotor může být použit například promotor metalothioninu (MT), který má několik *cis* prvků, které jsou responzivní na těžké kovy (Palmiter, R.D., 1987, Experimentia Supplementum, 52, 63-80, Birkhäuser Verlag). Kromě toho může být pro tento účel použit promotor genu, který je exprimován např. specificky pro buněčný cyklus, specificky pro typ buňky nebo vývojově specificky.

Ve speciálním provedení vynálezu transgen obsahuje cDNA hTBP a sekvence DNA, které kódují epitop HA (např. 9 aminokyselin přirozeného epitopu HA) a epitop His (např. značka 6x his) a konstitutivní promotor. Například exprese TBP je regulována promotorem pro lidský elongační faktor-1 alfa (EF) (Uetsuki, et al., 1989, J. Biol. Chem., 264, 5791-5798). Promotor EF je promotor bez TATA, který byl použit k expresi transgenů u myši v mírných, ale konstantních hladinách (Hanaoka, K., et al., 1991, Differentiation, 183-189). Ve speciálním provedení vynálezu obsahuje transgen sekvenci DNA, která kóduje dvojitě značený (epitop HA a His) hTBP a sekvenci promotoru EF, transgen konkrétně má sekvenci DNA s identifikačním číslem 14.

V dalším speciálním provedení vynálezu transgen obsahuje DNA, která kóduje TBP, nejlépe cDNA z hTBP a sekvence DNA, které kódují epitop HA (např. 9 aminokyselin přirozeného epitopu HA) a epitop His (např. 6x his) a indukovatelný promotor. Indukovatelný promotor je nejlépe

promotor metalothioninu (MT). Například v případě, že zavedení přídatné sekvence kódující TBP do genomu zvířat a následná exprese TBP nebo fúzního proteinu TBP je toxická, toto provedení vynálezu umožní zvířeti donosit plod s transgenem kódujícím fúzní protein TBP, který zůstává umlčený, dokud není promotor uveden do činnosti. Promotor může být indukován například, když je zvíře plně dospělé nebo v jakémkoliv zkoumaném vývojovém stadiu, např. v případě promotoru MT intraperitoneální injekcí obsahující divalentní kationty jako Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} nebo Cd^{2+} . Jak bylo ukázáno na jiných modelech, gen řízený MT se poté exprimuje ve zvýšené míře (Palmiter, R.D., et al., 1982, Cell, 29, 701-710). V konkrétním provedení vynálezu transgen obsahuje sekvenci DNA, která kóduje dvojitě značený hTBP (epitop HA a HIS) a promotor MT, transgen konkrétně má sekvenci DNA s identifikačním číslem 15.

Vynález se dále týká způsobu vytvoření transgenu připojením sekvence(i) DNA, která kóduje jednu nebo více epitopových značek, k sekvenci DNA, která kóduje protein TBP.

Vynález se dále týká použití transgenu. Transgen může být například použit pro přípravu rekombinantního vektoru.

Vynález se také týká způsobu přípravy rekombinantního vektoru. Tento způsob zahrnuje integraci transgenu do příslušného vektoru, např. vektoru, který obsahuje regulační sekvence. Příklady vektorů jsou expresní vektory a retroviry nebo jejich deriváty.

Vynález se dále týká použití rekombinantních vektorů, které obsahují transgen. Vynález se konkrétně týká použití rekombinantního vektoru, který obsahuje transgen (který např. obsahuje cDNA z TBP nebo jeho derivátu, zejména hTBP, a sekvencí DNA kódujících epitopové značky, například

sekvence DNA kódující epitop HA a His). Vynález se týká použití vektoru pro zavedení transgenu do eukaryotické buňky, zejména pro zavedení do savčí buňky. Vynález se dále týká použití vektoru obsahujícího tento transgen pro amplifikaci transgenní DNA v bakteriích nebo eukaryotických buňkách. Eukaryotická buňka, do které je zaveden vektor obsahující transgen, může být také použita pro heterologní/transgenní expresi transgenu. Eukaryotická buňka (hostitelská buňka) může být částí transgenního zvířete.

V hlavním provedení vynálezu je transgen použit pro přípravu transgenního zvířete kromě člověka. Transgen nebo rekombinantní vektor obsahující transgen je proto zaveden do hostitelské buňky a/nebo zvířete. V dalším ohledu se vynález týká transgenního zvířete kromě člověka, které vzniklo zavedením transgenu do zvířete nebo jeho buňky. Transgenní zvíře podle vynálezu má schopnost exprimovat nebo nadměrně exprimovat TBP nebo fúzní protein obsahující nebo se skládající z TBP s epitopovou značkou.

Pro přípravu transgenního zvířete je jako hostitelské zvíře použito zvíře kromě člověka. Toto zvíře kromě člověka zahrnuje obratlovce, jako jsou hlodavci, primáti kromě člověka, ovci, kozu, psa, krávu, prase, ptáky, obojživelníky, plazy apod. Preferovaná zvířata jsou vybrána ze savčích druhů zvířat kromě člověka, výhodně zvířat řádu hlodavců včetně krys a myší, nejvýhodněji myší.

Transgenní zvíře kromě člověka podle vynálezu zahrnuje každé zvíře, do jehož genomu byla zavedena jedna nebo více kopií transgenu(ů), který řídí expresi nebo který kóduje TBP nebo jeho derivát, jako fúzní protein sestávající z TBP a epitopových značek nebo je obsahující. Transgenní zvíře by mělo mít schopnost exprimovat protein TBP se značeným epitopem. Ve speciálním provedení vynálezu může transgenní

zvíře mít transgenním způsobem přerušen nebo vyřazen endogenní gen(y) TBP („knock-out“ zvíře).

Transgenní zvíře podle vynálezu je zvíře, do kterého byl zaveden prostředky jinými než přirozenými (tj. lidskou manipulací) jeden nebo více genů TBP (transgenů podle vynálezu), které se u zvířete přirozeně nevyskytují, např. cizorodý gen TBP nebo jeho deriváty, jako genetickým inženýrstvím změněný endogenní nebo cizorodý TBP. Gen TBP jiný než přirozeně se vyskytující se nazývá transgen. Transgen může být z téhož nebo odlišného druhu, jako je zvíře, ale v každém případě transgen se přirozeně nenalézá u zvířete v konfiguraci a/nebo chromozomovém lokusu transgenem obsazeném.

Transgen (transgenová DNA) může obsahovat cizorodý gen kódující TBP, tj. sekvence, které nejsou normálně nalezeny v genomu hostitelského zvířete, jako gen TBP nebo cDNA získaná z odlišných zvířecích druhů. Jako alternativu nebo přídavek může transgen obsahovat endogenní gen kódující TBP, např. sekvence DNA, které jsou abnormální v tom, že byly jinak uspořádány nebo mutovány *in vitro*, aby se změnil normální *in vivo* model exprese genu TBP nebo aby se změnila či vyloučila biologická aktivita endogenního TBP. Vynález se také týká expresních vektorů, které obsahují transgen a které mohou být použity k přípravě transgenního zvířete.

Vynález se dále týká způsobu přípravy transgenního zvířete podle vynálezu. Transgenní zvíře podle vynálezu může být tvořeno zavedením transgenu a/nebo vektoru, např. expresního vektoru, který obsahuje transgen, do zárodečné linie nebo buňky zárodečné linie a/nebo do somatické buňky zvířete kromě člověka. Pro zavedení transgenu podle vynálezu mohou být například použity embryonální cílové buňky v různých vývojových stádiích. V závislosti na stavu vývoje

embryonální cílové buňky(buněk) mohou být aplikovány různé metody. Některé příklady jsou:

1. Preferovanou metodou pro zavedení transgenu do genomu zvířat v praxi vynálezu je mikroinjekce zygot. Mikroinjekce vyžaduje izolaci embryí ve stadiu jedné buňky. Proto je preferovanou cílovou buňkou pro mikroinjekci transgenní DNA (DNA transgenu) zygota, oplodněné vajíčko, které neprodělalo fúzi pronukleů nebo následné buněčné dělení. Pronukleus myšího samce dosahuje velikosti přibližně 20 mikrometrů v průměru, což umožňuje reprodukovatelnou injekci 1-2 pl roztoku obsahujícího transgenní DNA. Použití zygoty pro zavedení transgenu má výhodu, že ve většině případů je injikovaná transgenní DNA zavedena do genomu hostitelského zvířete před prvním buněčným dělením (Brinster, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 4438-4442). V důsledku toho všechny buňky výsledných transgenních zvířat (zakladatelských zvířat) trvale nesou zavedený transgen v konkrétním genetickém lokusu, který se nazývá transgenní alela. Transgenní alela vykazuje mendelovskou dědičnost: polovina potomků, kteří jsou výsledkem křížení transgenního zvířete s netransgenním zvířetem zdědí transgenní alelu, podle mendelovských pravidel náhodného výběru.

Všeobecně používané postupy pro manipulaci s embryem a pro mikroinjekce transgenní DNA jsou detailně popsány v „Transgenic Animal Technology - A Laboratory Handbook“, editor Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc., 1994.

2. Pro zavedení transgenu podle vynálezu do zvířete může být také použita virová integrace. Vyvíjející se embrya jsou kultivována *in vitro* do vývojového stadia známého jako blastocysta. V tomto okamžiku mohou být blastomery infikovány vektory obsahujícími transgen (transgenní DNA/DNA

konstrukty), pro tento účel může být použit například příslušný virový nebo retrovirový vektor (Jaenich, R., 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1260-1264). Transformace nebo infekce blastomer může být zvýšena enzymatickým odstraněním *zona pellucida* (Hogan et al., 1986, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Jestliže je do blastomer zaveden prostřednictvím virových vektorů transgen, jsou takové vektory typicky defektní co se týče replikace, ale zůstávají kompetentní pro integraci transgenních sekvencí DNA, které jsou spojeny s vektorovými sekvencemi, do genomu hostitelského zvířete (Jahner et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6927-6931, Van der Putten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6148-6152). Transfekce se snadno a účinně dosáhne kultivací blastomer v jedné vrstvě buněk produkujících vektor obsahující transgen (Van der Putten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6148-6152, Stewart et al., 1987, EMBO, 6, 383-388).

Jako alternativa může být infekce provedena v pozdějším stadiu, jako je blastokéla (Jahner, D., et al., 1982, Nature, 298, 623-628). Většina transgenních zakladatelských zvířat tvořených retrovirovou nebo virovou integrací má transgen pouze v podskupině všech buněk, které tvoří transgenní zakladatelské zvíře. Kromě toho v jednom zakladatelském zvířeti mohou nastat mnohonásobné (retro)virové integrační jevy, dávající vznik násobným transgenním alelám, které se segregují v budoucích generacích potomků. Zavedení transgenů do zárodečných buněk tímto způsobem je možné, ale pravděpodobně nastane s nízkou frekvencí (Jahner, D., et al., 1982, Nature, 298, 623-628). Avšak jakmile je jednou transgen touto metodou zaveden do zárodečných buněk, může být produkováno potomstvo, ve kterém

je transgenní alela přítomná ve všech zvířecích buňkách, tj. jak v buňkách somatických, tak zárodečných.

3. Jako cílové buňky pro zavedení transgenu podle vynálezu do zvířat mohou také sloužit embryonální kmenové (ES) buňky. Buňky ES se získají z preimplantačních embryí, která mohou být pěstována *in vitro* (Evens, M.J., et al., 1981, *Nature*, 292, 154-156, Bradley, M.O., et al., 1984, *Nature*, 309, 255-258, Gossler et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9065-9069, Robertson et al., 1986, *Nature*, 322, 455-448, Robertson, E.J., in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, E.J., ed., IRL Press, Oxford, 1987, str. 71-112). Buňky ES, které jsou komerčně dostupné (např. od Genome Systems, Inc., St. Louis, MO), mohou být transformovány s jedním nebo více transgeny zavedenými metodami (Lovell-Badge, R.H., in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, E.J., ed., IRL Press, Oxford, 1987, str. 153-182). Transformované buňky ES mohou být kombinovány se zvířecí blastocystou, zatímco buňky ES kolonizují embryo a přispívají k zárodečné linii výsledného zvířete, které je chiméra (složené z buněk pocházejících ze dvou nebo více zvířat) (Jaenisch, R., 1988, *Science*, 240, 1468-1474, Bradley, A., in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, E.J., ed., IRL Press, Oxford, 1987, str. 113-151). Opět platí, že jakmile je jednou transgen zaveden do zárodečných buněk touto metodou, může být produkováno potomstvo, ve kterém je transgenní alela přítomná ve všech zvířecích buňkách, tj. jak v buňkách somatických, tak zárodečných.

Počáteční zavedení transgenu, ať nastane jakkoliv, není mendelovská událost. Ale transgen podle vynálezu může být trvale integrován do buněk zárodečné linie a přenášen na

potomstvo transgenního zvířete jako mendelovský lokus. Zárodečná integrace je podstatná pro produkci transgenních zvířat, která mohou přenášet genetickou informaci na své potomstvo mendelovským způsobem, a aby se využila tato transgenní zvířata jako stálé zvířecí modely.

Další transgenní techniky mají za následek mozaiková transgenní zvířata, ve kterých některé buňky nesou transgen a jiné buňky ne. V mozaikových transgenních zvířatech, ve kterých buňky zárodečné linie nenesou transgen, nenastává přenos transgenu na potomky. Nicméně mozaiková transgenní zvířata jsou schopna projevit fenotypy sdružené s transgenem a mohou být použita pro afinitní purifikaci konkrétních transkripčních komplexů, TAFs a faktorů interagujících s TAF. Vynález se týká mozaikových transgenních zvířat, která obsahují popsaný transgen podle vynálezu.

Vynález se dále týká transgenně zavedených mutací, což zahrnuje nulové („knock-out“) alely, ve kterých je sekvence DNA kódující druhově specifický TBP odstraněna (deletována) a/nebo substituována geneticky změněnou sekvencí TBP (např. transgen podle vynálezu) téhož nebo odlišného druhu a je regulována promotorem(y)/zesilovačem(i) dle výběru.

Vynález se týká transgenních zvířat, do kterých byl zaveden transgen obsahující DNA kódující TBP s epitopovou značkou, a je-li nezbytné, spojený s konstitutivním nebo indukovatelným promotorem. Vynález se zejména týká transgenních zvířat, do kterých byl zaveden transgen, který obsahuje DNA kódující hTBP s epitopovou značkou HA a His a sekvencí DNA promotoru EF. V dalším speciálním provedení se vynález týká transgenního zvířete, do kterého byl zaveden transgen, který obsahuje DNA kódující hTBP s epitopovou značkou HA a His a sekvencí DNA promotoru MT. Ve speciálním provedení vynálezu transgenní zvíře obsahuje transgen se

sekvencí s identifikačním číslem 13. Další transgenní zvíře vynálezu obsahuje transgen se sekvencí s identifikačním číslem 14. Další transgenní zvíře vynálezu obsahuje transgen se sekvencí s identifikačním číslem 15. Vynález se zejména týká transgenního zvířete, které má do svého genomu trvale zaveden transgen, například sekvenci DNA s identifikačním číslem 13, sekvenci s identifikačním číslem 14 a/nebo sekvenci s identifikačním číslem 15.

Potomek, který zdědil transgen, může být odlišen od sourozenců, kteří transgen nezdědili, analýzou genetického materiálu potomka na přítomnost biologických molekul, které obsahují sekvence jednoznačně odpovídající sekvencím transgenů, nebo jsou jím kódovány. Proto tedy mohou být imunologicky testovány na přítomnost polypeptidu kódovaného transgenem, např. TBP s epitopovou značkou, například biologické tekutiny, které obsahují polypeptidy (např. TBP s epitopovou značkou) jednoznačně kódované transgenem podle vynálezu. Jednodušší a spolehlivější prostředek pro identifikaci transgenního potomka zahrnuje získání vzorku tkáně např. z končetiny nebo ocasu zvířete, a analýzu vzorku na přítomnost sekvencí nukleové kyseliny odpovídajících sekvenci DNA jednoznačné části nebo částí transgenů podle vynálezu. Přítomnost takové sekvence nukleové kyseliny může být určena např. hybridizační (Southernovou, northernovou) analýzou se sekvencemi DNA odpovídajícími jednoznačně částem transgenů, analýzou produktů reakcí PCR za použití sekvencí DNA ve vzorku jako substrátu a oligonukleotidů odvozených ze sekvence DNA transgenů, atd.

Vynález se proto také týká testů, kdy může být testována případná první generace transgenních zvířat (G_0), a také všechny další generace transgenních zvířat (G_1 , G_2 , G_3 , G_4 ...) nebo zvířat transgenních zvířecích linií, na

přítomnost transgenu, např. standardními reakcemi PCR. Pro tento účel může být extrahována ze zvířecích tkání genomová DNA, například z tkáně ocasu, po ošetření s proteinázou K a RNázou. Pro tyto reakce PCR by měla sekvence primerů odpovídat částem sekvence transgenu, např. v promotorových oblastech, oblasti(tech) DNA kódující epitopovou značku(y) a/nebo oblastech DNA jednoznačných pro konkrétní konstrukt TBP. S takovými reakcemi PCR může být například u myši detekován v asi 25 % injikovaných vajíček odpovídající produkt reakce PCR, tj. asi 25 % myši produkují pozitivní potomstvo.

Další způsob, jak ověřit, zda zvířata nesou či nenesou transgen, se týká testu na přítomnost transgenní mRNA v případných transgenních zvířatech/transgenních zvířecích liniích. Počáteční testování může být například prováděno analýzou S1, která je velmi citlivá na malá množství mRNA (Berk, A.J., a Sharp, P.A., 1977, Cell, 12, 721). Pro tento účel jsou hybridizovány značené „antisense“ oligonukleotidy (s orientací opačnou ke směru transkripce) s celkovou RNA, která byla izolována z tkáně zvířete. Následné ošetření nukleázou S1 štěpí všechny jednovláknové nukleové kyseliny, DNA a RNA. Dvojvláknové DNA nebo hybridy DNA-RNA jsou ponechány neporušené. Jestliže je přítomná jakákoliv transgenní mRNA, hybridizuje s antisense oligonukleotidem, a tím je tedy chráněna před štěpením nukleázou S1.

Vynález zahrnuje také detekci přítomnosti transgenní mRNA v tkáňových preparátech, např. v preparátech celkové jaterní mRNA prostřednictvím S1 protekčních testů. Mohou být syntetizovány antisense oligonukleotidy, které jsou komplementární k části transgenní mRNA (např. mRNA odpovídající sekvenci DNA TBP s epitopovou značkou). Oligonukleotidy jsou označeny, např. na 5' konci, a například

radioaktivně se ^{32}S , ^{33}P , ^{35}P , ^3H nebo ^{14}C nebo fluorescenčními markery či jinými typy markerů, jako je biotin nebo digoxigenin. Značené oligonukleotidy jsou smíseny s mRNA z transgenní myši za selektivních hybridizačních podmínek podle standardních laboratorních protokolů (Sambrook et al., 1989). Směs je poté ošetřena nukleázou S1. Krátká oblast neodpovídající sekvence, např. na 3' konci oligonukleotidu, by měla být vždy naštěpena a skýtá vnitřní kontrolu, která ukáže, že nukleáza S1 vskutku štěpí všechny dostupné jednovláknové nukleové kyseliny. V přítomnosti transgenní mRNA by značený oligonukleotid měl být chráněn před štěpením a jeho přítomnost a velikost by měla být snadno určena např. elektroforézou v denaturačním gelu podobném gelu při sekvenování (např. PAGE s 8 M močovinou). Přítomnost nenaštěpeného značeného oligonukleotidu může být poté detekována např. expozicí gelu na film. V nepřítomnosti transgenní mRNA by nevznikl žádný pás, neboť nechráněný oligonukleotid by byl naštěpen nukleázou S1. Vynález zahrnuje také to, že odlišné tkáně a buňky odpovídající různým buněčným typům byly připraveny ze zvířat a testovány na přítomnost transgenní mRNA.

Další provedení vynálezu se týká testování transgenních zvířat northernovou analýzou. Nejvýhodněji byla transgenní zvířata, která byla shledána pozitivními pro transgenní mRNA metodou PCR nebo mapováním nukleázou S1, dále testována northernovou analýzou (McMaster, G.K. a Carmichael, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 4835). Pro tento účel může být izolována celková RNA z různých tkání a/nebo buněčných typů a separována dle velikosti např. za denaturujících podmínek na agarózovém gelu. RNA může být poté navázána například na membránu nebo filtr za použití např. kapilárního přenosu a vazba fixována UV světlem. Navázaná RNA může být testována

sondou za použití obvyklých podmínek pro northernův přenos (blotování) se značenou sondou odpovídající kódující oblasti transgenu nebo jeho části, např. s DNA sondou odpovídající 5' konci transgenu podle sekvence s identifikačním číslem 13. Takové DNA sondy jsou výhodně dlouhé asi 20 až 1000 párů bazí (bp). Nejvýhodněji jsou dlouhé asi 100, 200, 300, 400 a 500 bp. Je-li nutné, je přebytek značené sondy odmyt a membrána je exponována filmu. Sondy mohou být značeny, jak je popsáno výše pro oligonukleotidy. Pro tyto pokusy s northernovým přenosem mohou být někdy také použity oligonukleotidy.

Transgenní zvíře, výhodně takové transgenní zvíře, které bylo pozitivní v každém dalším molekulárně biologickém testu, je testováno na přítomnost transgenního proteinu TBP specifickou imunoreakcí např. westernovým přenosem nebo testem ELISA. Za tímto účelem mohou být izolována standardními postupy jádra z tkáně nebo konkrétních buněk zvířat, výhodně z jaterní tkáně nebo jakékoliv měkké tkáně, např. na sacharózovém gradientu při odstředování v ultracentrifuze. Z těchto jader může být soustředěn celkový jaderný protein, např. ošetřením jader vysokou koncentrací solí (např. 400 mM KCl) a neiontovým surfaktantem (např. NP-40). Poté může být jaderný protein separován dle velikosti, např. příslušnou elektroforézou v denaturačním gelu, výhodně SDS-PAGE. Tyto gely mohou být přeneseny, např. elektrickým přenosem, na pevný povrch, např. membrány nebo filtry, výhodně na nitrocelulózovou membránu. Membrány nebo filtry mohou být poté předem blokovány, a pak zkoušeny s vhodnými protilátkami podle standardních laboratorních protokolů (Sambrook et al., „Molecular Cloning“, druhé vydání, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Pro tento účel mohou být použity polyklonální a/nebo monoklonální protilátky, které se tvoří např. v myši, králíkovi, kryse, ovci, koze, koni, ptácích apod. Detekce může být provedena přímo s protilátkami, které rozpoznávají fúzní protein TBP a které jsou spojeny s enzymem nebo markerem, např. alkalickou fosfatázou nebo fluorescenčním markerem nebo biotinem nebo digoxigeninem nebo označeny radioaktivně. Detekce se může také provádět nepřímo použitím druhé protilátky, která rozpoznává konzervativní oblast primární protilátky, například, když se první protilátka tvoří v myši, druhá protilátka musí být protimyší protilátka tvořící se například v ovci. Tato druhá protilátka může být pro detekci také spojena s enzymem nebo jinými markery.

Vynález se dále týká použití transgenu nebo jeho části nebo kódovaného fúzního proteinu nebo jeho části pro tvorbu protilátek, které vážou TBP s epitopovou značkou kódovaný transgenem, např. k přípravě monoklonálních nebo polyklonálních protilátek.

Protilátky vztahující se k vynálezu jsou protilátky, které rozpoznávají jeden nebo více epitopů fúzního proteinu TBP. Tyto protilátky mohou být namířeny proti jednotlivému epitopu(ům) patřícímu k TBP a/nebo mohou být namířeny proti epitopové značce(značkám). Jedno provedení vynálezu se týká protilátky, která rozpoznává amino-koncovou část fúzního proteinu TBP. Další provedení vynálezu se týká protilátky, která rozpoznává epitop sousedící s částí aminokyselinové sekvence, kde jsou TBP a epitopová značka(y) a/nebo dvě epitopové značky spojeny dohromady.

Jedno provedení vynálezu se týká protilátky, která rozpoznává epitop fúzního proteinu, který se skládá z hTBP a dvou epitopových značek. Protilátka konkrétně rozpoznává epitop fúzního proteinu skládajícího se ze značek His a HA

a hTBP. Protílátka nejvýhodněji rozpoznává epitop(y) na amino-koncové části TBP značeného HA a His. Speciální provedení vynálezu se týká protílátky, která rozpoznává aminokyselinovou sekvenci s identifikačním číslem 16 nebo epitop správně uspořádaného fúzního proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci s identifikačním číslem 16 nebo jeho část. Vynález se týká protílátky (protílátek anti-TBP), která rozeznává aminokyselinovou sekvenci s identifikačním číslem 17 nebo její správně uspořádaný epitop, výhodně v souvislosti s fúzním proteinem TBP.

Protílátky vynálezu mohou být polyklonální nebo monoklonální. Protílátka se může tvořit ve všech druzích zvířat kromě člověka, výhodně v myši, kryse, králíkovi, ovci, koze, koni, ptácích (např. v jejich vejcích). Tato protílátka se může tvořit podle standardních laboratorních protokolů (Hurlow a Lane, „Antibodies: A Laboratory Manual“, 1988, Cold Spring Harbor Press). Protílátky mohou být, je-li to nezbytné, afinitně purifikovány za použití originálního imunizačního peptidu (epitopu). Speciální provedení vynálezu se týká polyklonálních protílátek tvořených v králíkovi, které jsou tvořeny imunizací králíka peptidem majícím sekvenci s identifikačním číslem 17 (např. spojeným s vhodným proteinovým nosičem). Polyklonální protílátka (protílátka anti-TBP) rozpoznává fúzní protein hTBP (značky HA a His).

Protílátka týkající se vynálezu může být použita pro analýzu westernovým přenosem, a také pro afinitní purifikaci fúzního proteinu TBP a transkripčních komplexů vyššího řádu, které jsou sdružené s fúzním proteinem TBP. Komplexy vyššího řádu obsahují TAFs, které jsou sdruženy s fúzním proteinem TBP a faktory interagujícími s TAF.

Vynález se týká použití transgenního zvířete. Transgenní zvíře podle vynálezu může být použito pro společnou afinitní purifikaci transkripčních komplexů vyššího řádu, TAFs a faktorů interagujícími s TAF z tkáně transgenních zvířat a/nebo kultivovaných buněk transgenního zvířete. Tyto transkripční komplexy vyššího řádu mohou být izolovány a purifikovány z celé řady různých tkání a/nebo buněčných typů. Z takových tkání/buněčných typů se výhodně provádějí jaderné preparáty, nejvýhodněji z homogenizovaných buněk podle standardních laboratorních protokolů (Dignam et al., 1983, Nuc. Acids Res., 11, 1575, Lichtenstein et al., 1987, Cell, 51, 963-973, Gorsky et al., 1986, Cell, 47, 767-776). Je-li nezbytné, mohou být jaderné proteiny poté hromaděny standardními metodami. Proto se vynález také týká způsobů společné afinitní purifikace vyšších nebo transkripčních komplexů, TAFs a faktorů interagujícími s TAF z transgenních zvířat.

Vynález se například týká afinitní purifikace transkripčních komplexů vyššího řádu, TAFs a faktorů interagujícími s TAF za použití protilátek specifických pro epitop nebo materiálů, které nesou náboj (pozitivní nebo negativní). Pro tento účel mohou být použity například protilátky již detailně popsané. Jeden z nejvýhodnějších společně purifikujících způsobů pro transkripční komplexy vyššího řádu, které obsahují TBP s epitopem značeným HA a His, výhodně hTBP, zahrnuje afinitní purifikaci za použití Ni^{2+} a/nebo protilátek anti-HA (např. komerčně dostupných protilátek) a/nebo protilátek rozpoznávajících epitop podle sekvence s identifikačním číslem 17. Tyto protilátky nebo Ni^{2+} mohou být spojeny s vhodným materiálem na kolony tak, že afinitní purifikace se může provádět za použití např. Ni^{2+}

kolon nebo kolon se specifickými protilátkami, např. s protilátkami anti-HA nebo protilátkami anti-TBP.

V dalším provedení se vynález týká fúzního proteinu TBP, TBP s epitopovou značkou. Fúzní protein TBP je výhodně exprimován v transgenním zvířeti. Vynález se zejména týká fúzního proteinu hTBP. Fúzní protein TBP může být izolován a purifikován z transgenního zvířete. Jedno provedení vynálezu je protein TBP značený HA a His, konkrétně protein hTBP značený HA a His. Další provedení vynálezu je protein, který má aminokyselinovou sekvenci s identifikačním číslem 16. V dalším provedení vynálezu obsahuje fúzní protein TBP jedno nebo více štěpných míst pro proteinázu/peptidázu, např. štěpné místo pro trombin. Štěpná místa jsou výhodně lokalizována v aminokyselinové sekvenci fúzního proteinu mezi epitopovou značkou(ami) a proteinem TBP.

Vynález se týká způsobu přípravy fúzního proteinu TBP, kde je transgen podle vynálezu exprimován ve vhodné hostitelské buňce, která je výhodně částí transgenního zvířete.

Transgenní mRNA a/nebo fúzní protein TBP kódovaný transgenem a/nebo transkripční komplex vyššího řádu sdružené s fúzním proteinem TBP mohou být izolovány z různých typů tkání a/nebo buněčných typů, které se nalézají v transgenním zvířeti, např. mozek, srdce, ledviny, játra, plíce, nervový systém, sval, žlázy, kostní dřeň, buňky patřící k imunitnímu systému, kůže atd.

Vynález se týká použití fúzního proteinu TBP, konkrétně pro izolaci transkripčních komplexů vyššího řádu z transgenního zvířete, a pro charakterizaci izolovaných transkripčních komplexů vyššího řádu získaných od různých druhů, z různých tkání a/nebo různých buněčných typů. Fúzní protein TBP a transgenní zvíře podle vynálezu mohou být tedy

použity pro izolaci a charakterizaci jednotlivých proteinů, jako jsou TAFs a faktory interagující s TAF, které jsou sdruženy v různé komplexy vyššího řádu. Například proteiny spojené v konkrétním transkripčním komplexu vyššího řádu mohou být disociovány a separovány tak, že mohou být identifikovány jednotlivé TAFs a faktory sdružené s TAF. Složení TAFs a faktorů interagujících s TAF se v různých komplexech vyššího řádu do alespoň určité míry liší v závislosti na typu tkáně a/nebo buňky a/nebo vývojovém stadiu a/nebo transgenu, který je exprimován.

TAFs a faktory interagující s TAF, zejména tkáňově specifické faktory, které již byly charakterizovány a pro které již existují protilátky, mohou být rychle identifikovány a může u nich být určen stupeň asociace s transkripčními komplexy. Příkladem toho je faktor Bob-I/OCA-B, který je považován za tkáňově specifický koaktivátor zodpovědný za aktivaci omezenou na B buňky (Gstaiger, M., et al., 1996, EMBO, 15, 2781-2790). Ačkoliv bez vnitřní kapacity vázající DNA a požadavku pro téměř všudypřítomné faktory Oct, tkáňově omezený výskyt tohoto faktoru propůjčuje B buňce specifickou transkripční aktivaci prostřednictvím mechanismu protein-protein.

Dále, nové TAFs a faktory interagující s TAF, zejména TAFs a faktory interagující s TAF, které jsou tkáňově specifické a/nebo specifické pro buněčný typ a/nebo specifické pro vývojové stadium a/nebo specifické pro buněčný cyklus, mohou být identifikovány v transkripčním komplexu vyššího řádu. Jak je zmíněno výše, existuje hojnost dat, která silně svědčí pro to, že mnoho tkáňově specifických faktorů vázajících zesilovač je schopno projevit vliv, a tudíž tkáňovou specifitu, na transkripční aktivitu genu. Mohou být proto identifikovány „jedinečné“

faktory, které jsou tkáňově specifické, specifické pro buněčný typ, specifické pro buněčný cyklus, specifické pro vývojové stadium, které regulují specifickou expresi genů.

Tento „univerzální“ transgenní systém dále skýtá výkonný nástroj pro zkoumání stupně, do kterého se takové TAFs a faktory interagující s TAF (např. ko-aktivátory) spojují s TBP a/nebo TAFs a transkripčním komplexem v řadě tkání a buněčných typů.

Vynález se také týká způsobu identifikace a charakterizace různých transkripčních komplexů vyššího řádu, kdy je z transgenního zvířete izolován TBP s epitopovou značkou, k němuž jsou připojeny transkripční komplexy vyššího řádu. Způsob charakterizace složení různých transkripčních komplexů vyššího řádu může například obsahovat a) zavedení transgenu podle vynálezu do zvířete kromě člověka, b) izolaci TBP s epitopovou značkou z různých zvířecích tkání a/nebo různých buněčných typů zvířete, volitelně v odlišných vývojových stadiích zvířete a c) určení složení transkripčních komplexů vyššího řádu.

Jeden způsob izolace transkripčního komplexu vyššího řádu z transgenního zvířete kromě člověka obsahuje afinitní purifikaci za použití alespoň jedné epitopové značky připojené k TBP. Výhodně jsou transkripční komplex vyššího řádu a TAFs a faktory interagující s TAF sdružené v tomto komplexu purifikovány společně, když je izolován TBP s epitopovou značkou. Například transkripční komplex vyššího řádu může být izolován, když je purifikován TBP s epitopovou značkou navázáním jednoho z jeho epitopů, výhodně epitopové značky, k látce, ke které se epitop váže specificky. Tato látka může být například Ni^{2+} kolona (ke které se váže epitop His) nebo protilátky, např. protilátky anti-HA (vážou epitop HA) nebo protilátky, které se vážou k epitopu TBP

s epitopovou značkou, se sekvencí s identifikačním číslem 17 nebo její částí (např. epitop sekvence s identifikačním číslem 17).

Vynález se také týká způsobu identifikace nového a/nebo specifického TAF a/nebo faktoru interagujícího s TAF. Transkripční komplex vyššího řádu je výhodně izolován z transgenního zvířete podle vynálezu. Tento způsob může například zahrnovat a) zavedení transgenu podle vynálezu do zvířete kromě člověka, b) izolaci TBP s epitopovou značkou z určité zvířecí tkáně a/nebo určitého buněčného typu zvířete, volitelně v určitém vývojovém stadiu zvířete a c) disociace a separace TAF a/nebo faktoru interagujícího s TAF sdruženého s TBP s epitopovou značkou v transkripční komplex vyššího řádu a d) a je-li to nezbytné, také určení aminokyselinové sekvence TAF a/nebo faktoru interagujícího s TAF.

Kromě potvrzení již známých mechanismů má transgenní model výhodu proti současným systémům buněčných kultur v tom, že vede k nalézání a charakterizaci nových TAFs nebo faktorů sdružených s TAF. Jak je zmíněno výše, proteiny TAFs, které byly do současnosti afinitně společně purifikovány, pocházejí ze studií na HeLa buňkách a kvasinkách. Byly také nalezeny cDNA pro TAF z dalších organismů, ale metodami testování interakčních knihoven, což je časově náročné. Fakt, že transgenní model zahrnuje „celý organismus“, činí tento univerzální transgenní systém obzvláště vhodný k rozpoznání nových tkáňově specifických aktivačních prvků také proto, že zůstává velmi „blízko“ ke skutečnému procesu transkripce *in vivo*.

Je jasné, že takové transgenní zvíře exprimující značený TBP, např. myš, by bylo schopné přispět k oblasti vývoje léků. Značný farmaceutický zájem může být přisouzen

jakýmkoliv „jedinečným“ faktorům tkáňově specifickým, specifickým pro buněčný typ, specifickým pro buněčný cyklus, specifickým pro vývojové stadium (TAFs, faktory interagující s TAF), určitých genových transkripčních komplexů, obzvláště jestliže se jedná o gen mající vztah k nemoci. Identifikace a charakterizace „klíčových“ TAFs a faktorů interagujících s TAF, které jsou zapojeny v transkripční kontrole jednoho nebo několika genů majících vztah k nemoci, je platná strategie pro vyvinutí léčivých sloučenin, které zmírňují takové genetické nemoci. Jakmile byl jednou takový TAF nebo faktor interagující s TAF charakterizován a klonován, může být podniknut jakýkoliv počet testovacích postupů, aby se identifikovaly molekulární druhy/látky, které specificky interagují s TAF nebo faktorem sdruženým s TAF. Farmaceuticky použitelný druh molekuly nebo látka by byla ta, která zesiluje nebo potlačuje přirozenou aktivitu TAF nebo faktoru interagujícího s TAF *in vitro* a/nebo *in vivo*, a tím umožní léčebně ovlivnit příslušný gen.

Identifikované TAFs a faktory interagující s TAF mohou být poté také použity jako nástroje v biochemii a v molekulární biologii, například takové proteiny z transgenních zvířat kromě člověka mohou být použity jako sondy pro izolaci odpovídajících lidských TAFs a faktorů interagujících s TAF nebo jejich cDNA. Lidské TAFs a faktory interagující s TAF mohou být poté také použity pro testování vysoce specifických nových léků.

Předkládaný vynález je dále detailněji popsán v následujících neomezujících příkladech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Vytvoření transgenních zvířat

Možné zdroje zvířat:

Zvířata vhodná pro transgenní pokusy byla získána ze standardních komerčních zdrojů, Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), a The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Myši B6SJL/F1 byly použity pro výběr embrya a přenos. Samci B6SJL/F1 mohou být použity pro páření a vazektomování chovní samci „Swiss Webster“ mohou být použiti pro stimulaci pseudogravidity.

Transgenní myši:

U samic myši starých šest týdnů je vyvolána superovulace injekcí 5 IU (0,1 cm³, intraperitoneálně) gonadotropinu ze séra březí klisny (PMSG, např. Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), která je následována o 48 hodin později injekcí 5 IU (0,1 cm³, intraperitoneálně) lidského choriového gonadotropinu (hCG, např. Sigma). Samice jsou umístěny k samcům okamžitě po injekci hCG. Dvacet jedna hodin po podání hCG jsou spárené samice usmrceny zadušením v CO₂ nebo dislokací krční páteře a z vyříznutých vejcovodů se získají embrya, která se umístí do živného média M2 (např. Sigma). Buňky obklopující ovariální vyklenutí se odstraní hyaluronidázou (1 mg/ml). Pronukleární embrya jsou poté omyta a umístěna v živném médiu M16 (např. Sigma) a poté vložena do inkubátoru s teplotou 37 °C se zvlhčovanou atmosférou v 5% CO₂, O₂ a 90% N₂ až do doby injekce.

Příklad 2

Příprava konstruktů pro transfekce a mikroinjekce

DNA klony pro mikroinjekce byly štěpeny příslušnými enzymy, DNA klony obsahující transgen MT-hTBP (dvojitě značený, podle sekvence v tabulce 3) s ClaI a BamHI nebo transgen EF-hTBP (dvojitě značený, podle sekvence v tabulce 2) s EcoRI/EcoRI a fragmenty DNA o příslušné velikosti byly elektroforeticky rozděleny na 1% agarózových gelech v pufru TBE (Sambrook et al., 1989). Pásky DNA se vizualizovaly obarvením ethidiumbromidem, vyřízly a umístily do dialyzačních váček obsahujících 0,3 M octan sodný, pH 7,0. DNA se elektricky eluovala v dialyzačních váčkách, extrahovala směsí fenolu a chloroformu (1:1) a precipitovala dvěma objemy etanolu. DNA se opět rozpustila v pufru TE (10 mM Tris, pH 7,4, a 1 mM EDTA) a purifikovala na koloně DEAE sephacel (např. Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Kolona je nejdříve naplněna 0,5 ml pufru s vysokým obsahem soli (1,5 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4, a 1 mM EDTA), pak následuje promytí se 3 ml pufru s nízkým obsahem soli (0,15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, a 1 mM EDTA). Roztoky DNA jsou solí upraveny na koncentraci 0,15 M NaCl, a poté se nechají protékat kolonou, přičemž se DNA naváže na matrix kolony. Po třech promytích se 3 ml pufru s nízkým obsahem soli je DNA eluována poměrnými částmi 4x 0,3 ml pufru s vysokým obsahem soli a precipitována dvěma objemy etanolu. Frakce byly sloučeny rozpuštěním ve 200 μ l TE, jednou extrahovány směsí fenol-chloroform, dvakrát chloroformem, a poté byla DNA precipitována přes noc etanolem. DNA se resuspendovala v pufru TE pro mikroinjekce (10 mM Tris, pH 7,4, 0,1 mM EDTA) a koncentrace DNA se upravila na 2 ng/ μ l

a vizualizovala proti známým standardům DNA elektroforetickým rozdělením na agarózovém gelu.

Mikroinjekce:

Transgenní DNA (MT-hTBP nebo EF-hTBP) purifikovaná pomocí DEAE byla rozpuštěna v pufru pro mikroinjekce v koncentraci 2 ng/ μ l. Mikrojuhly a držící pipety byly nasazeny na mikropipetový tahač Flaming Brown, např. Model P87 (Sutter Inst. Co.). Držící pipety byly poté zlomeny a konce zataveny ohněm v mikrovýhni typu deFonbrune (např. Technical Product Inst. Inc). Pipety byly poté připevněny na mikromanipulátory (např. Leitz), které byly připojeny k mikroskopu Zeiss Axiovert® 135. Injekční pipeta naplněná vzduchem (např. Medical System Corp.) byla naplněna špičkou roztokem DNA. Embrya ve skupinách po 40-50 byla umístěna ve 200 μ l média M2 pod silikonový olej pro mikromanipulaci. Embryo bylo nastaveno a drženo držící pipetou, a poté byla vložena injekční pipeta do pronukleu, který byl injekční pipetě nejbližší. Injekce se sledovala zduřením pronukleu. Po injekci byla skupina embryí umístěna v médiu M16 až do přenosu do přijímajících samic.

Příklad 3

Přenos embrya mikroinjekcí

Náhodně ovulující dospělé samice myší jsou spárovány s vazektomovanými samci. Pro tento účel může být použit kmen Swiss Webster nebo jiný srovnatelný kmen. Přijímající samice jsou spářeny v tutéž dobu jako dárcovské samice. V čase přenosu embrya jsou přijímající samice podrobeny anestezii intraperitoneální injekcí 0,015 ml 2,5% avertinu na 1 g

tělesné hmotnosti. Vejcovody jsou odkryty jednou incizí v dorzální střední čáře. Poté je provedena incize přes tělní stěnu přímo nad vejcovodem. Pak je protržen ovariální váček hodinářskou pinzetou. Embrya, která mají být přenesena, jsou umístěna v médiu M16 a poté ve špičce přenášející pipety (asi 10-12 embryí). Špička pipety je vložena do infundibula a embrya jsou přenesena. Po přenosu je incize uzavřena dvěma stehy a kůže sesvorkována. Příjemkyně se zotavovala tři hodiny na vyhřívané podložce a pak byla umístěna do kolonie do doby porodu.

Celkem bylo mikroinjikováno 469 pronukleárních embryí pro MT-hTBP a narodilo se 170 mlád'at a celkem 407 pronukleárních embryí pro EF-hTBP poskytlo 76 mlád'at.

Příklad 4

Detekce transgenní DNA v zakladatelských myších (tj. transgenních myších první generace)

4a) Extrakce DNA:

Genomová DNA případných zakladatelských myši byla extrahována z malého kousku ocasní tkáně (přibližně 1 cm) odříznuté potomku starému 2-4 týdny. Ocasní řezy se inkubovaly přes noc na třepačce v 500-750 μ l pufru pro ocasní řezy (pufr pro ocasní řezy: 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS, 30 μ g/ml Proteinase K). Ke každému vzorku ocasu byl následně přidán stejný objem směsi fenol/chloroform/ isoamylalkohol (25:24:1). Vzorky se jemně protřepaly ručně nebo automaticky míchadlem Vortex s nízkými obrátkami. Všechny vzorky se stočily 10 minut ve stolní centrifuze. Vodná fáze se přenesla do 5ml polypropylénové zkumavky (např. zkumavky Falcon®). Do zkumavky se pomalu

přidával (po kapkách) stejný objem etanolu, aby umožnil DNA postupně precipitovat. Druhý objem etanolu se přidal prudce, aby promíchal obsah zkumavky. Zkumavky byly poté několikrát převráceny pro zajištění promíchání. DNA se poté namotala na neostrou pipetovou špičku (špičku pro sekvenační gel) a přenesla se do samostatné jamky na mikrotitrační destičce. Poté se DNA nechala schnout na vzduchu po 4 hodiny. Pak se přidalo 200 μ l 1x TE do každé jamky (1x TE: 10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA). Genomová DNA se poté ponechala rozpouštět po dobu 15-30 minut při teplotě místnosti, pak se jemně promíchala opatrným pipetováním. Před testováním metodou PCR (polymerázová řetězová reakce) byly mikrotitrační destičky často skladovány v -20 °C. Před testováním se odebralo 10 μ l a naštěpilo s EcoRI (např. 10 μ l genomové DNA, 2 μ l 10x pufr pro EcoRI, 7 μ l H₂O, 1 μ l EcoRI, enzym a pufr od Boehringer Mannheim, Mannheim, Německo).

4b) Reakce PCR:

Naštěpená genomová DNA byla naředěna vodou v poměru 1:3. Vzorke byly poté zahřívány ve 100 °C v tepelném bloku po dobu 10 minut. Pak se použily 2 μ l pro reakce PCR. Reakce se prováděly v objemu 50 μ l, který se skládal z 2 μ l genomové DNA, 1x reakčního pufru, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 μ M oligonukleotidového předního („forward“) primeru, 0,8 μ M oligonukleotidového zpětného („reverse“) primeru, 8 μ l směsi nukleotidů obsahující každý nukleotid v 0,2 mM koncentraci (dATP, dCTP, dTTP a dGTP) a 2,5 jednotky Taq polymerázy. PCR se prováděla za použití např. enzymu a pufru AmpliTaq® od firmy Perkin Elmer (Perkin Elmer Norwalk, Connecticut, USA).

Detekce transgenu MT-hTBP se prováděla za použití oligonukleotidového předního primeru („sense primer“) 5' GGA GCA ACC GCC TGC TGG GTG C 3' (sekvence s identifikačním

nukleotidy. Derivát DNA může být také sůl, výhodně fyziologická tolerovatelná sůl.

Transgen obsahuje jednu nebo více sekvencí DNA, které kódují jeden, dva, tři, čtyři, pět nebo více epitopových značek. Transgen výhodně obsahuje DNA, která kóduje dvě epitopové značky. DNA kódující jednotlivé epitopové značky může být lokalizována na 5' a/nebo 3' konci DNA, která kóduje TBP, a/nebo v jakékoliv vhodné pozici uprostřed sekvence DNA, která kóduje TBP. DNA kódující jednotlivé epitopové značky může být oddělena a/nebo seřazena za sebou nebo může být přímo sousedící.

Jako epitopová značka může být použit jakýkoliv přirozený nebo syntetický peptid. Každá epitopová značka je exprimována jako fúzní protein s TBP, epitopová značka může být např. spojena s TBP přímo nebo vmezeřeným peptidem. Epitopová značka by měla výhodně nabízet možnost pro afinitní purifikaci TBP nebo fúzního proteinu a pro afinitní purifikaci proteinů, které jsou sdruženy s TBP nebo fúzním proteinem, jako TAFs a faktory interagující s TAF. Kromě toho by epitopová značka neměla zničit funkční aktivitu TBP, když je exprimována jako fúzní protein s TBP. Pro tento účel jsou výhodně použity jako epitopové značky krátké peptidy. Mohou obsahovat asi 1 až 50 nebo více aminokyselin, jsou používány zejména peptidy, které obsahují 5 až 15 aminokyselin. Neomezující příklady peptidů, které mohou být použity jako epitopové značky, jsou epitop-FLAG, epitop-HA, násobné histidinové zbytky (6 až 10 nebo více histidinových zbytků) (značka His), značka Myc (Stone et al., 1996, Nature, 384, 129-134), streptavidinové značky a další. Pro tento účel mohou být použity také kratší peptidy přirozených epitopů. Například použití epitopu HA zahrnuje použití epitopů „MGYPYDVPDYA“ (sekvence s identifikačním číslem 2),

číslem 5) a oligonukleotidového zpětného primeru („antisense primer“) 5' CCT GTG TTG CCT GCT GGG ACG 3' (sekvence s identifikačním číslem 6).

Detekce transgenu EF-hTBP se prováděla za použití oligonukleotidového předního primeru 5' GGA GAC TGA AGT TAG GCC AGC 3' (sekvence s identifikačním číslem 7). Byl použit stejný zpětný primer, jako pro detekci MT-hTBP (5' CCT GTG TTG CCT GCT GGG ACG 3').

Teplotní cyklování se provádělo za použití automatického tepelného cyklovače (např. od firmy Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Teploty v jednotlivých cyklech byly:

cyklus 1: 94 °C, 5 min - 60 °C, 3 min - 72 °C, 2 min

cyklus 2-25: 94 °C, 1 min - 60 °C, 2 min - 72 °C, 3 min

cyklus 26: 94 °C, 1 min - 60 °C, 2 min - 72 °C, 5 min

nebo

cyklus 1-40: 95 °C, 2 min - 55 °C, 1 min - 72 °C, 1 min

Výskyt amplifikovaných produktů se zjišťoval provedením standardní elektroforézy v agarózovém gelu (např. 1,2-1,5% agaróza) a obarvením gelu ethidiumbromidem pro vizualizaci DNA v UV světle.

Pozitivní vzorky MT-hTBP byly rozeznány podle výskytu amplifikovaného produktu DNA o velikosti asi 580 bp. Pozitivní vzorky EF-hTBP tvořily amplifikovaný fragment DNA o velikosti asi 500 bp.

Analýza DNA ze 170 mláďat na MT-hTBP reakcí PCR ukázala, že 35 vzorků genomové DNA bylo pozitivní na výskyt transgenu. Analýza genomové DNA ze 76 EF-hTBP mláďat analýzou PCR ukázala, že transgen EF-hTBP byl obsažen v 9 myších.

4d) Rozvoj transgenního modelu:

Zakladatelé G_0 s pozitivní DNA byli kříženi s netransgenními protějšky kmene B6SJL a výsledné vrhy byly genotypizovány pomocí PCR. Potomci G_1 byli použiti pro kontinuální křížení a udržování jednotlivých linií a pro další analýzy mRNA a exprese proteinů.

Příklad 5

Detekce transgenní mRNA „protekčním“ testem pomocí S1 nukleázy:

5a) Charakteristika:

Byly vytvořeny oligonukleotidy komplementární k 5' konci a 3' konci transgenního transkriptu:

Sekvence 5' oligonukleotidu („sense primer“) (sekvence s identifikačním číslem 8):

5'GCGGCACCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGGCTGCTGCCCATGA
CTGCGTAATGCGGTCATGACGCTTT3'

Sekvence 3' oligonukleotidu („antisense primer“) (sekvence s identifikačním číslem 9):

5'GAAGGGGGTGGGGGAGGCAAGGGTACATGAGAGCCATTACGTCGTCTTCCT
GAATCCCTTTAGCCGCTTTGCTCG3'

Podtržené oblasti jsou nehybridizující sekvence. 40 ng oligonukleotidu bylo značeno na 5' konci s (^{32}P gama)ATP (5000 cpm/mM) za použití T4 polynukleotidkinázy a pufru např. od firmy Boehringer Mannheim (Mannheim). Reakce se prováděla v 50 μl reakčního objemu ve 30 °C po 1 hodinu. Označený oligonukleotid byl oddělen od nezačleněného (^{32}P gama)ATP za použití vylučovací chromatografie (např. Push-Columns®, Stratagene, La Jolla, CA, USA).

5b) Indukce promotoru:

Před analýzou RNA bylo nezbytné indukovat myši MT-hTBP, protože promotor je aktivován v přítomnosti Zn^{2+} . Každé myši MT-hTBP byly podány dvě intraperitoneální injekce $ZnSO_4$ v H_2O 18 hodin a opět 4 hodiny před odstraněním jater (dávka byla 0,1 mg $ZnSO_4$ /10 g hmotnosti myši).

5b) Extrakce RNA:

Celková RNA se extrahovala z 1-5 g tkáně za použití komerčně dostupné reagentie Trizol (např. Gibco-BRL, Paisly, UK). Tkáň se homogenizovala pomocí Ultra-Turrax v 5 ml roztoku Trizol ve 12ml propylénové zkumavce (např. zkumavce Falcon®). Přidal se 1 ml chloroformu a zkumavky se uzavřely víčkem a důkladně ručně protřepaly po dobu 15 s. Roztoky se inkubovaly při teplotě místnosti po 3 min, a poté se stočily ve 12 000 x g po 15 minut ve 4 °C v rotoru Sorvall SS-34. Supernatant se přenesl do nové zkumavky, přidalo se 2,5 ml izopropanolu a promísilo. Následovala inkubace po dobu 10 minut při teplotě místnosti. Vzorky se stočily ve 12 000 x g po 10 minut ve 4 °C. Supernatant se odstranil a peleta RNA se omyla 5 ml 75% etanolu. Vzorky se promíchaly a stočily v 7 500 x g po 10 minut. Pelety RNA se resuspendovaly ve vodě bez RNázy a následně kvantifikovaly měřením absorbance ve 260 nm.

5d) „Protekční“ test pomocí S1 nukleázy:

Stejná množství RNA (10-20 μ g) byla doplněna na 100 μ l vodou bez RNázy. Bylo přidáno 50 000-150 000 cpm značeného oligonukleotidu (0,1-1 ng, v závislosti na účinnosti značení). Směs RNA/oligonukleotid se precipitovala 0,3 M octanem sodným a etanolem. Peleta RNA/oligonukleotid se opláchla a usušila na vzduchu. Přidalo se 23 μ l

hybridizačního roztoku (80% formamid, 10 mM PIPES, pH 6,4 (Sambrook et al., 1989), 1 mM EDTA, 0,05% SDS). Reakční směs se promíchala a denaturovala 20 minut v 65 °C, a poté se ke každému vzorku přidaly 2 μ l 5 M NaCl v 65 °C. Vzorky se inkubovaly 1 další hodinu v 65 °C ve vodní lázni, a poté byla teplota lázně nastavena na 37 °C. Postupné snížení teploty z 65 °C na 37 °C (přes noc) usnadnilo specifickou hybridizaci oligonukleotid-mRNA. Příští den se ke každému vzorku přidalo 300 μ l pufru S1 (pufr S1: 167 U/ml S1 nukleázy (např. Gibco BRL, Paisly, UK), 0,3 M NaCl, 30 mM NaOAc (pH 4,5), 3 mM ZnSO₄). Vzorky se inkubovaly 1 hodinu při teplotě místnosti, poté se přidal 1 ml etanolu (studeného), aby se precipitovala všechna nukleová kyselina. Peleta se poté stočila a omyla a krátce osušila ve vakuu v přístroji Speed-Vac. Poté se peleta resuspendovala ve 12 μ l nanášecího pufru S1 (85% formamid, 0,01 % bromfenolová modř, 0,01% xylencyanol, 1x TBE). Vzorky se zahřívaly v 70 °C po dobu 5 minut před tím, než se nanasly a separovaly dle velikosti za použití elektroforézy s denaturačním (6 M močovina) tenkým polyakrylamidovým gelem. Autoradiografie suchého gelu usnadnila detekci chráněných nenaštěpených pásů.

Ze 35 zakladatelských zvířat pro MT-hTBP vykazovalo 7 zakladatelských zvířat detekovatelné hladiny mRNA při analýze S1 protekčním testem. Pro EF-hTBP ukazovala 3 zakladatelská zvířata při analýze S1 detekovatelnou mRNA.

Příklad 6

Detekce transgenní mRNA northernovým přenosem

6a) Syntéza hybridizační sondy amplifikací PCR z TBP a značení sondy TBP:

Byly navrženy a syntetizovány oligonukleotidy/primery vymezující fragment o velikosti 498 bp z dvojité značeného konstruktů hTBP.

Přední oligonukleotid začínal 10 bází po směru transkripce („downstream“) od startovacího místa „AUG“ (místo ATG v tabulce 1). Sekvence tohoto „sense“ primeru byla:

sekvence s identifikačním číslem 10:

5'CCCTATGACGTCCCGGATTACG3'.

Zpětný primer končil 507 bp po směru transkripce od startovacího místa „AUG“ (místo ATG v tabulce 1). Sekvence tohoto „antisense“ primeru byla:

sekvence s identifikačním číslem 11:

5'GTGGAGTGGTGCCCGGCAAGGG3'.

Reakce PCR se prováděly s 0,2 µg pAG-17, 0,5 mM MgCl₂, 0,8 µM každého primeru, 1x pufr PCR (Perkin-Elmer), 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP a 2,5 U enzymu AmpliTaq® (Perkin Elmer Norwalk, Connecticut, USA).

Program teplotního cyklovače:

cykly 1-35: 94 °C, 2 min - 55 °C, 1 min - 72 °C, 1 min, poté 10 minut v 72 °C, pak uskladnění ve 4 °C. Amplifikované pásy byly purifikovány z 0,7% agarózového gelu.

Sonda TBP-DNA byla značena pomocí náhodných primerů a enzymu Klenowova fragmentu ze značící soupravy Megaprime® (Amersham, UK). 25-50 ng DNA sondy se smísilo s 5 µl náhodných hexamerových primerů (např. Amersham) a 20 µl H₂O.

DNA se denaturovala ve 100 °C po dobu 5 minut. Značící směs byla doplněna do konečného objemu 50 µl 1x reakčním pufrem, 1x dATP, 1x dTTP, 1x dGTP, 4 µl 3000 Ci/mmol alfa-³²P dCTP (např. Amersham) a 2 U Klenowova enzymu. Reakce se ponechala při teplotě místnosti po 1 hodinu. Značená DNA se oddělila od nezačleněných nukleotidů použitím vylučovací chromatografie (např. Push-Columns®).

6b) Gelová elektroforéza a přenos

10-20 µg celkové RNA bylo precipitováno etanolem, peleta byla denaturována 10 minut v 65 °C v RNA nanášecím pufru (65% formamid, 20% formaldehyd (37% roztok), 1x pufr MOPS (Sambrook et al., 1989), 5% glycerol, 0,01% bromfenolová modř, 0,01% xylencyanol, 0,1 mg/ml ethidiumbromid). RNA byla rozdělena dle velikosti na 1% agarózovém gelu obsahujícím 18% formaldehyd (37% roztok) a 1x MOPS jako pufr pro elektroforézu (40 mM MOPS, pH 7,0, 10 mM octan sodný, 1 mM EDTA). Gely se nechaly běžet pomalu přes noc při 1 V/cm v 1x MOPS jako pufru pro elektroforézu obsahujícím 18% formaldehyd (37% roztok). Gely se poté ošetřily v 0,05 M NaOH/1,5 M NaCl po dobu 30 minut, následováno 20 minutami v 0,5 M Tris (pH 7,4)/1,5 M NaCl. RNA se přenesla na nylonovou membránu (např. Hybond-N+, Amersham, UK) za použití techniky kapilárního přenosu. RNA navázaná na membránu byla fixována např. UV světlem za použití přístroje Stratalinker® (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

6c) Hybridizace a odmyváání

Prehybridizace se prováděla například v pufru „Rapid-Hyb“ (Amersham, UK) v rotační hybridizační pídce (např. Hybaid) v 65 °C po dobu 1-2 hodin. Hybridizace se prováděla

například v 6-10 ml pufru „Rapid-Hyb“ obsahujícím 10^6 - 10×10^6 cpm denaturované sondy v 65 °C po dobu 2-3 hodiny. Membrána se odmyla dvakrát při teplotě místnosti (10 minut/odmytí) v 2x SSC/0,1% SDS (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM citrát sodný, pH 7,0). Membrána se dále odmyla 2x v 65 °C (15 minut/odmytí) v 1x SSC/0,1% SDS. Další dvě odmytí se prováděla v 65 °C po dobu 15 minut v 0,5x SSC/0,1% SDS, následováno 1 nebo 2 konečnými odmytími (bylo-li nutné) po dobu 15 minut/odmytí v 65 °C 0,2x SSC/0,1% SDS. Provedla se autoradiografie odmyté membrány.

Příklad 7:

Tvorba polyklonální protilátky specifické pro značený hTBP

Všeobecná strategie:

Mezi myším a lidským TBP existuje významná sekvenční homologie. Proto bude většina komerčně dostupných protilátek zkříženě reagovat a tudíž detekovat jak endogenní, tak transgenní TBP. Aby se rozlišilo mezi těmito dvěma, vytvořila se polyklonální protilátka proti značené oblasti transgenního TBP (odpovídající štěpnému místu trombinu a značce His značeného hTBP): sekvence s identifikačním číslem 12: H₂N--MGSSHHHHHSSGLVPRGC--COOH.

Tento peptid byl připojen k proteinovému nosiči a injikován do králíků za použití standardních laboratorních protokolů. V pravidelných intervalech se odebíralo sérum a testovalo se na titer protilátek anti-hTBP za použití testů ELISA.

Příklad 8

Detekce transgenního proteinu westernovým přenosem:

8a) Příprava jaderných extraktů z jater:

MT-hTBP myši byly podrobeny 2 intraperitoneálním injekcím $ZnSO_4$ (viz 5b). Myši byly usmrceny dislokací krční páteře a játra byla odstraněna. Játra byla okamžitě homogenizována v 10 ml homogenizačního pufru (1,8 M sacharóza, 10 mM HEPES, pH 7,4 (Sambrook et al., 1989), 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 0,15 mM spermin, 0,5 mM spermidin, 0,4 mM PMSF). Po homogenizaci byl objem doplněn na 25 ml tímtož puforem. Homogenát byl opatrně navrstven na 7 ml homogenizačního pufru do centrifugačních zkumavek, např. do zkumavek Ultra-Clear SW-28® (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Vzorky byly stočeny v rotoru SW-28 1 hodinu v 25 000 rpm (4 °C). Supernatant byl opatrně odstraněn a peletovaná jádra byla resuspendována ve 200 μ l pufru NEXB (20 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10% glycerol, 2 μ g/ml aprotininu, 2 μ g/ml leupeptinu, 2 μ g/ml pepstatinu-A). Resuspendovaná jádra se inkubovala na ledu po 15-30 minut s častým mícháním pomocí pipetování. Vzorky byly podrobeny 5 cyklům zmrazení/rozmrazení v lázni suchý led/etanol a vodní lázni 37 °C. Poté se vzorky stočily 30 s ve vysokých otáčkách a v supernatantu se měřil obsah proteinů, např. s reagentií proteinového testu (např. Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

8b) Elektroforéza a přenos:

20-75 μ g extraktu bylo separováno dle velikosti denaturační gelovou elektroforézou. Analytický gel: 10% akrylamid (poměr akrylamid:bis-akrylamid je 1:37), 0,1% SDS,

375 mM Tris, pH 8,8. Srovnávací gel: 5% akrylamid, 0,1% SDS, 125 mM Tris, pH 8,3. Pufř pro elektroforézu: 25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM glycin, 0,1% SDS. Protein byl přenesen na čistě nitrocelulózovou membránu (např. Bio-Rad) přístrojem pro polosuchý přenos (např. Hoefer, San Francisco, CA, USA) za použití modifikovaného přenosového pufru dle Bjerruma (48 mM Tris, 39 mM glycin, 10% metanol, 0,0375% SDS, pH 9,2). Přenos se ponechal běžet při 0,8 mA/cm po 2-4 hodiny.

8c) Imunodetekce:

Membrány byly blokovány 1-2 hodiny při teplotě místnosti v 1x TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl) s 3% želatinou (např. Bio-Rad) na laboratorní kývací plošině. Membrány se odmývaly 10 minut v 1x TTBS (1x TBS s 0,05% Tween-20) při teplotě místnosti. Hybridizace s primární protilátkou v 1% želatině/1 x TTBS se prováděla 4 hodiny až přes noc na kývací plošině při teplotě místnosti. Membrány se odmývaly 2-3krát (5 minut/odmytí) s 1x TTBS. Hybridizace se sekundární protilátkou spojenou s alkalickou fosfatázou (AP) v 1% želatině/1 x TTBS se prováděla po 2-3 hodiny. Membrány se opět odmývaly 2-3krát (5 minut/odmytí) s 1x TTBS při teplotě místnosti, následováno 5 minutovým odmytím v pufru 1x TBS. Poté byly membrány inkubovány v 1x vyvolávacím pufru (např. Bio-Rad) obsahujícím reagentie NBT/BCIP při teplotě místnosti, dokud se dostatečně neobjevily pásy. Reakce AP byla zastavena odmytím H₂O.

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

GGAGCAACCG CCTGCTGGGT GC

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE:SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

CCTGTGTTGC CTGCTGGGAC G

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE:SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

GGAGACTGAA GTTAGGCCAG C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 76 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...76

(xi) POPIS SEKVENCE:SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

GCGGCACCAG GCCGCTGCTG TGATGATGAT GATGATGGCT GCTGCCCATG 50
ACTGCGTAAT GCGGTCATGA CGCTTT 76

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 75 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...75

(xi) POPIS SEKVENCE:SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

GAAGGGGGTG GGGGAGGCAA GGGTACATGA GAGCCATTAC GTCGTCTTCC 50
TGAATCCCTT TAGCCGCTTT GCTCG 75

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 22 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...22

(xi) POPIS SEKVENCE:SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

CCCTATGACG TCCCGGATTA CG

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 22 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...22

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

GTGGAGTGGT GCCCGGCAAG GG

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: peptid
- (B) POZICE: 1...19

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

Met	Gly	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val
1				5					10				15	

Pro Arg Gly Cys

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1310 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1...1310

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

CCATGGGCTA TCCCTATGAC GTCCCGGATT ACGCAGTCAT GGCAGCAGC CATCATCATC	60
ATCATCACAG CAGCGGCCTG GTGCCGCGG GCAGCCATAT GGATCAGAAC AACAGCCTGC	120
CACCTTACGC TCAGGGCTTG GCCTCCCCTC AGGGTGCCAT GACTCCCGGA ATCCCTATCT	180
TTAGTCCAAT GATGCCTTAT GGCCTGGAC TGACCCACACA GCCTATTCAG AACACCAATA	240
GTCTGTCTAT TTTGGAAGAG CAACAAAGGC AGCAGCAGCA ACAACAACAG CAGCAGCAGC	300
AGCAGCAGCA GCAGCAACAG CAACAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC	360
AGCAGCAGCA GCAGCAGCAA CAGGCAGTGG CAGCTGCAGC CGTTCAGCAG TCAACGTCCC	420
AGCAGGCAAC ACAGGGAACC TCAGGCCAGG CACCACAGCT CTTCCACTCA CAGACTCTCA	480
CAACTGCACC CTTGCCGGGC ACCACTCCAC TGTATCCCTC CCCCATGACT CCCATGACCC	540
CCATCACTCC TGCCACGCCA GCTTCGGAGA GTTCTGGGAT TGTACCGCAG CTGCAAATA	600
TTGTATCCAC AGTGAATCTT GGTGTAAAC TTGACCTAAA GACCATTGCA CTTCGTGCCC	660
GAAACGCCGA ATATAATCCC AAGCGGTTTG CTGCGGTAAT CATGAGGATA AGAGAGCCAC	720
GAACCACGGC ACTGATTTTC AGTTCTGGGA AAATGGTGTG CACAGGAGCC AAGAGTGAAG	780
AACAGTCCAG ACTGGCAGCA AGAAAATATG CTAGAGTTGT ACAGAAGTTG GGTTTTCCAG	840
CTAAGTTCTT GGACTTCAAG ATTCAGAACA TGGTGGGGAG CTGTGATGTG AAGTTTCCTA	900
TAAGGTTAGA AGGCCTTGTG CTCACCCACC AACAAATTAG TAGTTATGAG CCAGAGTTAT	960
TTCCTGGTTT AATCTACAGA ATGATCAAAC CCAGAATTGT TCTCCTTATT TTTGTTTCTG	1020
GAAAAGTTGT ATTAACAGGT GCTAAAGTCA GAGCAGAAAT TTATGAAGCA TTTGAAAACA	1080
TCTACCCTAT TCTAAAGGGA TTCAGGAAGA CGACGTAATG GCTCTCATGT ACCCTGCCT	1140
CCCCACCCC CTTCTTTTTT TTTTTTTAAA CAAATCAGTT TGTTTTGGTA CCTTTAAATG	1200
GTGGTGTGTG GAGAAGATGG ATGTTGAGTT GCAGGGTGTG GCACCAGGTG ATGCCCTTCT	1260
GTAAGTGCCC CTTCCGGCAT CCCGGAATTC CTGCAGCCCA ACGCGGCCGC	1310



(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 4286 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

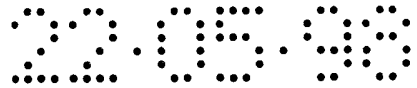
(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...4286

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

```
GAATTCCCCT GCAGGTCACT TAGCGTTGGC CACATAGTAG GTTCTCAAAT ACTTGTTAAT      60
AAATAAGTTT GTTCGAGAAG CTGGGCAATG ATATTCTACA GCTGGAAGAA GAAACATAAT      120
GATCTAGTAA TTAGCTCAAT TAAAAATAAA CGTTCTTCTT TCCTCAGAGG AGCATTTCCC      180
AAGGCCTGCC TTGATAGCCA TCCAAAAGG CCAAGCTCAT CCAATCTTGC CCTAGATTTA      240
TGCTAAAATG CAGTTACAAT CGATAGGATG ACAGAAAACG ACAGCACTTA TTAAATATA      300
ATAGGCACTT ATTTAAATAG GAGAAGCTGT GACTTCATAG CAAGTGTGG GGTAGGAAA      360
CTGGGTGGAT AAAGTGGCTG ATGCTGTAGA TCTTAGCCTC TACATGAGAT CATGTGGAAA      420
ATCTGAAAGC ATTTTAGGTT CTTATGTTT GCAATCAAAT AACTGTACAC CTTTAAATTT      480
AAAAAGTACC ATGAGGCACA CACACACACT CGCAGGAACT TTTGGCGTA ACAAAGTACTAG      540
AATTAGATCT AAAAGCTAAC TGTAGGACTG AGTCTATTCT AACTGAAAAG CCTGGACATC      600
TGGAGTACCA GGGGGAGATG ACGTGTACG GGCTCCATA AAAGCAGCTG GCTTTGAATG      660
GAAGGAGCCA AGAGGCCAGC ACAGGAGCGG ATTCGTCGCT TTCACGGCCA TCGAGCCGAA      720
CCTCTCGCAA GTCCGTGAGC CGTTAAGGAG GCCCCAGTC CCGACCCTC GCCCCAAGCC      780
CCTCGGGGTC CCCGGGCTG GTACTCCTTG CCACACGGGA GGGGCGCGGA AGCCGGGGCG      840
GAGGAGGAGC CAACCCCGGG CTGGGCTGAG ACCCGCAGAG GAAGACGCTC TAGGGATTG      900
TCCCGGACTA GCGAGATGGC AAGGCTGAGG ACGGGAGGCT GATTGAGAGG CGAAGGTACA      960
CCCTAATCTC AATACAACCT TTGGAGCTAA GCCAGCAATG GTAGAGGGAA GATTCTGCAC     1020
GTCCCTTCCA GCGGGCCTCC CCGTCACCAC CCCCCAAC CCGCCCCGAC CGGAGCTGAG     1080
```



AGTAATTCAT ACAAAGGAC TCGCCCCTGC CTTGGGAAT CCCAGGGACC GTCGTAAAC 1140
TCCCATAAC GTAGAACCA GAGATCGCTG CGTCCCGCC CCCTACCCG CCCGCTCTCG 1200
TCATCACTGA GGTGGAGAAG AGCATGCGTG AGGCTCCGGT GCCCGTCAGT GGGCAGAGCG 1260
CACATCGCCC ACAGTCCCG AGAAGTTGGG GGGAGGGTC GGCAATTGAA CCGGTGCCTA 1320
GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA ACTGGGAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTCC 1380
CGAGGGTGGG GGAGAACCGT ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTT TTTTCGCAA 1440
CGGGTTTGCC GCCAGAACAC AGGTAAGTGC CGTGTGTGGT TCCCGCGGGC CTGGCCTCTT 1500
TACGGTTAT GGCCCTGCG TGCCTGAAT TACTCCACG CCCCTGGCTG CAGTACGTGA 1560
TTCTTGATCC CGAGCTTCGG GTTGAAGTG GGTGGGAGAG TTCGAGGCCT TCGCTTAAG 1620
GAGCCCCTC GCCTCGTGCT TGAGTTGAGG CCTGGCCTGG GCGCTGGGGC CGCCGCGTGC 1680
GAATCTGGTG GCACCTTCGC GCCTGTCTCG CTGCTTTCGA TAAGTCTCTA GCCATTTAA 1740
ATTTTGATG ACCTGCTGCG ACGCTTTTTT TCTGGCAAGA TAGTCTTGTA AATGCGGGCC 1800
AAGATCTGCA CACTGGTATT TCGGTTTTG GGGCCGCGG CGGCGACGGG GCCCGTGCCT 1860
CCCAGCGCAC ATGTTCCGGC AGGCGGGGCC TCGAGCGCG GCCACCGAGA ATCGGACGGG 1920
GGTAGTCTCA AGCTGGCCGG CCTGCTCTGG TGCCTGGCCT CGCGCCGCG TGTATCGCCC 1980
CGCCCTGGGC GGCAAGGCTG GCCCGTCCG CACCAGTTGC GTGAGCGGAA AGATGGCCGC 2040
TTCCCGGCC TGCTGCAGGG AGCTCAAAAT GGAGGACGCG GCGCTCGGGA GAGCGGGCGG 2100
GTGAGTCACC CACACAAAGG AAAAGGGCCT TTCCGTCTC AGCCGTCGCT TCATGTGACT 2160
CCACGGAGTA CCGGGCGCCG TCCAGGCACC TCGATTAGTT CTCGAGCTTT TGGAGTACGT 2220
CGTCTTAGG TTGGGGGAG GGGTTTTATG CGATGGAGTT TCCCACACT GAGTGGGTGG 2280
AGACTGAAGT TAGGCCAGCT TGGCACTGA TGTAATTCTC CTTGGAATTT GCCCTTTTG 2340
AGTTTGATC TTGGTTCATT CTCAAGCCTC AGACAGTGGT TCAAAGTTTT TTTCTTCAT 2400
TTCAGGTGTC GTGAGGAATT GCCCGGGGA TCCATGGGCT ATCCCTATGA CGTCCCGGAT 2460
TACGCAGTCA TGGGCAGCAG CCATCATCAT CATCATACA GCAGCGGCCT GGTGCCCGC 2520
GGCAGCCATA TGGATCAGAA CAACAGCCTG CCACCTTAGC CTCAGGGCTT GGCCTCCCCT 2580
CAGGGTGCCA TGA TCCCGG AATCCCTATC TTTAGTCAA TGATGCCTTA TGGCACTGGA 2640
CTGACCCAC AGCCTATTCA GAACACCAAT AGTCTGTCTA TTTGGAAGA GCAACAAAG 2700
CAGCAGCAG AACAACAACA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGCAGCAACA GCAACAGCAG 2760



CAGCAGCAGC	AGCAGCAGCA	GCAGCAGCAG	CAGCAGCAGC	AGCAGCAGCA	ACAGGCAGTG	2820
GCAGCTGCAG	CCGTTTCAGCA	GTC AACGTCC	CAGCAGGCAA	CACAGGGAAC	CTCAGGCCAG	2880
GCACCACAGC	TCTTCCACTC	ACAGACTCTC	ACA ACTGCAC	CCTTGCCGGG	CACCACTCCA	2940
CTGTATCCCT	CCCCCATGAC	TCCCATGACC	CCCATCACTC	CTGCCACGCC	AGCTTCGGAG	3000
AGTTCTGGGA	TTGTACCGCA	GCTGCAAAAT	ATTGTATCCA	CAGTGAATCT	TGGTTGTAAA	3060
CTTGACCTAA	AGACCATTGC	ACTTCGTGCC	CGAAACGCCG	AATATAATCC	CAAGCGGTTT	3120
GCTGCGGTAA	TCATGAGGAT	AAGAGAGCCA	CGAACACCGG	CACTGATTTT	CAGTTCTGGG	3180
AAAATGGTGT	GCACAGGAGC	CAAGAGTGAA	GAACAGTCCA	GACTGGCAGC	AAGAAAATAT	3240
GCTAGAGTTG	TACAGAAGTT	GGGTTTTCCA	GCTAAGTTCT	TGGA CTCAA	GATTCAGAAC	3300
ATGGTGGGGA	GCTGTGATGT	GAAGTTTCCT	ATAAGGTTAG	AAGGCCTTGT	GCTCACCCAC	3360
CAACAATTTA	GTAGTTATGA	GCCAGAGTTA	TTTCTGGTT	TAATCTACAG	AATGATCAAA	3420
CCCAGAATTG	TTCTCCTTAT	TTTTGTTTCT	GGAAAAGTTG	TATTAACAGG	TGCTAAAGTC	3480
AGAGCAGAAA	TTTATGAAGC	ATTGAAAAC	ATCTACCCTA	TTCTAAAGGG	ATTCAGGAAG	3540
ACGACGTAAT	GGCTCTCATG	TACCCTTGCC	TCCCCACCC	CCTTCTTTTT	TTTTTTTTAA	3600
ACAAATCAGT	TTGTTTTGGT	ACCTTTAAAT	GGTGGTGTG	TGAGAAGATG	GATGTTGAGT	3660
TGCAGGGTGT	GGCACCAGGT	GATGCCCTTC	TGTAAGTGCC	CCTTCCGGCA	TCCCGGATAT	3720
CCTGCAGCCC	AACACGGCCG	CTCGAGCATG	CATCTAGAGA	ACGTCACGGC	CGCGATCCCC	3780
CTGTGCCTTC	TAGTTGCCAG	CCATCTGGTT	GTTTGCCCCT	CCCCCGTGCC	TTCCTTGACC	3840
CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTTCC	TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	3900
CTGAGTAGGT	GTCATTCTAT	TCTGGGGGGT	GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	3960
TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGGGAT	GCGGTGGGCT	CTATGGGTAC	CCAGGTGCTG	4020
AAGAATTGAC	CCGGTTCCTC	CTGGGCCAGA	AAGAAGCAGG	CACATCCCCT	TCTCTGTGAC	4080
ACACCCTGTC	CACGCCCTG	GTTCTTAGTT	CCAGCCCCAC	TCATAGGACA	CTCAACTTGG	4140
AGCGGTCTCT	CCCTCCCTCA	TCAGCCCACC	AAACCAAACC	TAGCCTCCAA	GAGTGGGAAG	4200
AAATTAAGC	AAGAAGGCTA	TTAAGTGCAG	AGGGAGAGAA	AATGCCTCCA	ACATGTGAGG	4260
AAGTAATGAT	AGAAATCATA	GAATTC				4286



(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 3263 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

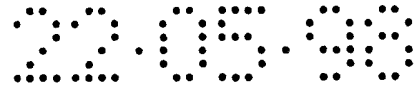
(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon
- (B) POZICE: 1...3263

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

```
ATCGATAAGC TGAGATCCGG CTAGAACTG CTGAGGGCTG GACCGCATCT GGGGACCATC      60
TGTTCTTGGC CCTGAGCGGG GCAGGAACTG CTTACCGCAG ATATCCTGTT TGCCCCAATT      120
CAGCTGTTCC ATCTGTTCTT GGCCCTGAGC GGGGCAGGAA CTGCTTACCA CAGATATCCT      180
GTTTGGCCCA TATTCAGCTG TCTCTCTGTT CCTGACCTTG ATCTGAACTT CTCTATTCTC      240
AGTTATGTAT TTTTCCCATG CCTTGCAAAA TGGCGTTACT TAAGCTAGCT TGCCAAACCT      300
ACGGCTGGGG TCTTTCACGT TTATATCTAT GAGGGGAAGG ACCCAGAGTG GGGGAGCTGG      360
GATCTTGGGA ACACGCTTCT CTACATGGCA TTGTCTGCAC GGTGGAGTCC GGATCTGAGC      420
TTGGCTTGGT TTTTAAAACC AGCCTGGAGT AGAGCAGATG GGTTAAGGTG AGTGACCCCT      480
CAGCCCTGGA CATTCTTAGA TGAGCCCCCT CAGGAGTAGA GAATAATGTT GAGATGAGTT      540
CTGTTGGCTA AAATAATCAA GGCTAGTCTT TATAAACTG TCTCCTCTTC TCCTAGCTTC      600
GATCCAGAGA GAGACCTGGG CGGAGCTGGT CGCTGCTCAG GAACTCCAGG AAAGGAGAAG      660
CTGAGGTTAC CACGCTGCGA ATGGGTTTAC GGAGATAGCT GGCTTTCCGG GGTGAGTTCT      720
CGTAAACTCC AGAGCAGCGA TAGGCCGTAA TATCGGGGAA AGCACTATAG GGACATGATG      780
TTCCACACGT CACATGGGTC GTCCTATCCG AGCCAGTCGT GCCAAAGGGG CGGTCCCCTG      840
GTGCACACTG GCGCTCCAGG GAGCTCTGCA CTCCGCCCGA AAAGTGCGCT CGGCTCTGCC      900
AGGACGCGGG GCGCGTGA CTGCGTGGGC TGGAGCAACC GCCTGCTGGG TGCAAACCCT      960
```

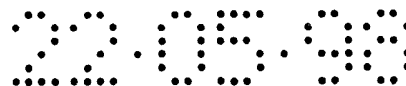


TTGCGCCCGG ACTCGTCCAA CGACTATAAA GAGGGCAGGC TGTCTCTAA GCGTCACCAC 1020
GACTTCAACG TCCTGAGTAC CTTCTCCTCA CTTACTCCGT AGCTCCAGCT TCACCAGATC 1080
CTCGAGAACG TCTCCCATGG GCTATCCCTA TGACGTCCCG GATTACGCAG TCATGGGCAG 1140
CAGCCATCAT CATCATCATC ACAGCAGCGG CCTGGTGCCG CGCGGCAGCC ATATGGATCA 1200
GAACAACAGC CTGCCACCTT ACGCTCAGGG CTTGGCCTCC CCTCAGGGTG CCATGACTCC 1260
CGGAATCCCT ATCTTTAGTC CAATGATGCC TTATGGCACT GGACTGACCC CACAGCCTAT 1320
TCAGAACACC AATAGTCTGT CTATTTTGA AGAGCAACAA AGGCAGCAGC AGCAACAACA 1380
ACAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA ACAGCAACAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA 1440
GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAACAGGCA GTGGCAGCTG CAGCCGTTCA 1500
GCAGTCAACG TCCCAGCAGG CAACACAGGG AACCTCAGGC CAGGCACCAC AGCTCTTCCA 1560
CTCACAGACT CTCACAAGT CACCCTTGCC GGGCACCCT CCACTGTATC CCTCCCCCAT 1620
GACTCCCATG ACCCCCATCA CTCCTGCCAC GCCAGCTTCG GAGAGTTCTG GGATTGTACC 1680
GCAGCTGCAA AATATTGTAT CCACAGTGAA TCTTGGTTGT AAACCTTGACC TAAAGACCAT 1740
TGCACCTCGT GCCCGAAACG CCGAATATAA TCCCAAGCGG TTTGCTGCGG TAATCATGAG 1800
GATAAGAGAG CCACGAACCA CGGCACTGAT TTTCAGTTCT GGGAAAATGG TGTGCACAGG 1860
AGCCAAGAGT GAAGAACAGT CCAGACTGGC AGCAAGAAAA TATGCTAGAG TTGTACAGAA 1920
GTTGGGTTTT CCAGCTAAGT TCTTGGACTT CAAGATTCAG AACATGGTGG GGAGCTGTGA 1980
TGTGAAGTTT CCTATAAGGT TAGAAGGCCT TGTGCTCACC CACCAACAAT TTAGTAGTTA 2040
TGAGCCAGAG TTATTTCTG GTTTAATCTA CAGAATGATC AAACCCAGAA TTGTTCTCCT 2100
TATTTTTGTT TCTGGAAAAG TTGTATTAAC AGGTGCTAAA GTCAGAGCAG AAATTTATGA 2160
AGCATTTGAA AACATCTACC CTATTCTAAA GGGATTCAGG AAGACGACGT AATGGCTCTC 2220
ATGTACCCTT GCCTCCCCCA CCCCCTTCTT TTTTTTTTTT TAAACAAATC AGTTTGTTTT 2280
GGTACCCTTA AATGGTGGTG TTGTGAGAAG ATGGATGTTG AGTTGCAGGG TGTGGCACCA 2340
GGTGATGCC TTCTGTAAGT GCCCCTTCG GCATCCCGGA ATTCCTGCAG CCCAACGCGG 2400
CCGCTTCGAG GGATCTTTGT GAAGGAACCT TACTTCTGTG GTGTGACATA ATTGGACAAA 2460
CTACCTACAG AGATTTAAAG CTCTAAGGTA AATATAAAAT TTTAAGTGT ATAATGTGTT 2520
AAACTACTGA TTCTAATTGT TTGTGATTT TAGATTCCAA CCTATGGAAC TGATGAATGG 2580

GAGCAGTGGT GGAATGCCTT TAATGAGGAA AACCTGTTTT GCTCAGAAGA AATGCCATCT	2640
AGTGATGATG AGGCTACTGC TGA CTCTCAA CATTCTACTC CTCCAAAAA GAAGAGAAAG	2700
GTAGAAGACC CCAAGGACTT TCCTTCAGAA TTGCTAAGTT TTTTGAGTCA TGCTGTGTTT	2760
AGTAATAGAA CTCTTGCTTG CTTTGCTATT TACACCACAA AGGAAAAAGC TGCACTGCTA	2820
TACAAGAAAA TTATGGAAAA ATATTCTGTA ACCTTTATAA GTAGGCATAA CAGTTATAAT	2880
CATAACATAC TGTTTTTCT TACTCCACAC AGGCATAGAG TGTCTGCTAT TAATAACTAT	2940
GCTCAAAAAT TGTGTACCTT TAGCTTTTTA ATTTGTAAAG GGGTTAATAA GGAATATTTG	3000
ATGTATAGTG CCTTGACTAG AGATCATAAT CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT	3060
TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT GAACCTGAAA CATAAAATGA ATGCAATTGT	3120
TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA	3180
TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTCACTGCA TTCTAGTTGT GGGTTGTCCA AACTCATCAA	3240
TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCC	3263

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 371 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (ix) ZNAKY:
 - (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
 - (B) POZICE: 1...371



(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

Met Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Val Met Gly Ser Ser
1 5 10 15

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His
20 25 30

Met Asp Gln Asn Asn Ser Leu Pro Pro Tyr Ala Gln Gly Leu Ala Ser
35 40 45

Pro Gln Gly Ala Met Thr Pro Gly Ile Pro Ile Phe Ser Pro Met Met
50 55 60

Pro Tyr Gly Thr Gly Leu Thr Pro Gln Pro Ile Gln Asn Thr Asn Ser
65 70 75 80

Leu Ser Ile Leu Glu Glu Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
85 90 95

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala
115 120 125

Val Ala Ala Ala Ala Val Gln Gln Ser Thr Ser Gln Gln Ala Thr Gln
130 135 140

Gly Thr Ser Gly Gln Ala Pro Gln Leu Phe His Ser Gln Thr Leu Thr
145 150 155 160

Thr Ala Pro Leu Pro Gly Thr Thr Pro Leu Tyr Pro Ser Pro Met Thr
165 170 175

Pro Met Thr Pro Ile Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ser Glu Ser Ser Gly
180 185 190

Ile Val Pro Gln Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu Gly Cys
195 200 205

Lys Leu Asp Leu Lys Thr Ile Ala Leu Arg Ala Arg Asn Ala Glu Tyr
210 215 220

Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu Pro Arg
225 230 235 240

Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr Gly Ala
245 250 255

Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala Arg Val
 260 265 270

Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys Ile Gln
 275 280 285

Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu Gly
 290 295 300

Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu Phe
 305 310 315 320

Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu Leu Ile
 325 330 335

Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg Ala Glu
 340 345 350

Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly Phe Arg
 355 360 365

Lys Thr Thr
 370

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: protein
- (B) POZICE: 1...18

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

Met Gly Ser Ser His His His His His His
 1 5 10

Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly
 15

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Transgenní zvíře kromě člověka, které má schopnost exprimovat protein vázající se na box TATA (TBP) opatřený epitopovou značkou.
2. Transgenní zvíře kromě člověka podle nároku 1, kde TBP je exprimován jako fúzní protein se dvěma epitopovými značkami.
3. Transgenní zvíře kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2, kde fúzní protein obsahuje lidský TBP (hTBP).
4. Transgenní zvíře kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde fúzní protein obsahuje epitop HA a His.
5. Transgenní zvíře kromě člověka podle nároku 4, kde fúzní protein má sekvenci s identifikačním číslem 16.
6. Transgenní zvíře kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde transgenní zvíře je myš.
7. Způsob vytvoření transgenního zvířete kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se transgen zavede do zárodečné linie a/nebo do somatických buněk zvířete kromě člověka.
8. Způsob vytvoření transgenního zvířete kromě člověka podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do zygoty zvířat kromě člověka zavede transgenní DNA mikroinjekcí.

9. Způsob vytvoření transgenního zvířete kromě člověka podle nároku 7 vyznačující se tím, že se blastocysta transfekuje vektorem, který obsahuje transgen.

10. Způsob vytvoření transgenního zvířete kromě člověka podle nároku 7 vyznačující se tím, že se transgen zavede do embryonální kmenové buňky.

11. Transgen, který kóduje TBP s epitopovou značkou a který může být použit pro vytvoření transgenního zvířete kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

12. Transgen podle nároku 11, který obsahuje první sekvenci DNA, která kóduje TBP a druhou sekvenci DNA, která kóduje jednu nebo více epitopových značek.

13. Transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 a 12, kde sekvence DNA, která kóduje TBP, je cDNA.

14. Transgen podle nároku 13, kde sekvence DNA je cDNA lidského TBP (hTBP).

15. Transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 14, kde druhá sekvence DNA kóduje dvě epitopové značky.

16. Transgen podle nároku 15, kde epitopové značky jsou epitop HA a epitop His.

17. Transgen podle kteréhokoliv z nároků 15 a 16, kde epitop HA má jednu ze sekvencí s identifikačním číslem 1, 2, 3 nebo 4.

18. Transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 17, který obsahuje sekvenci s identifikačním číslem 13.
19. Transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 18, který obsahuje DNA indukovatelného nebo konstitutivního promotoru.
20. Transgen podle nároku 19, kde promotor je promotor genu EF.
21. Transgen podle nároku 19, kde promotor je promotor genu MT.
22. Transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22, kde transgen má sekvenci s identifikačním číslem 14 nebo 15.
23. Použití transgenu podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22 pro vytvoření transgenního zvířete kromě člověka.
24. Způsob tvorby transgenu podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připojí sekvence DNA, která(é) kóduje(i) jednu nebo více epitopových značek, k sekvenci DNA, která kóduje protein TBP.
25. Použití transgenu podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22 pro vytvoření TBP s epitopovou značkou.
26. Použití transgenního zvířete podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro expresi TBP s epitopovou značkou.
27. TBP s epitopovou značkou exprimovaný v transgenním zvířeti podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

28. TBP s epitopovou značkou podle nároku 27, který obsahuje dva epitopy.

29. TBP s epitopovou značkou podle kteréhokoliv z nároků 27 a 28, kde TBP je hTBP.

30. TBP s epitopovou značkou podle kteréhokoliv z nároků 27 až 29, kde TBP je spojen s epitopem HA a epitopem His.

31. TBP s epitopovou značkou podle kteréhokoliv z nároků 27 až 30, kde epitop HA má jednu ze sekvencí s identifikačním číslem 1, 2, 3 nebo 4.

32. TBP se značeným epitopem podle kteréhokoliv z nároků 27 až 31, který má sekvenci s identifikačním číslem 16.

33. Způsob přípravy TBP s epitopovou značkou podle kteréhokoliv z nároků 27 až 32 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zavede transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22 do zárodečné linie a/nebo somatických buněk zvířete.

34. Způsob přípravy TBP s epitopovou značkou podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zavede transgen, který obsahuje konstitutivní promotor, do zvířete kromě člověka, načež TBP s epitopovou značkou je exprimován v určitých buněčných typech a/nebo tkáních zvířete, volitelně v určitém vývojovém stadiu zvířete.

35. Způsob přípravy TBP s epitopovou značkou podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zavede transgen, který obsahuje indukovatelný promotor, do zvířete kromě

člověka, a po indukci promotoru se exprimuje TBP s epitopovou značkou.

36. Použití TBP s epitopovou značkou pro izolaci transkripčních komplexů vyššího řádu z transgenního zvířete a pro identifikaci TAFs a faktorů interagujících s TAF.

37. Použití transgenního zvířete kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro expresi TBP s epitopovou značkou.

38. Použití transgenního zvířete kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro izolaci transkripčních komplexů vyššího řádu z různých tkání a/nebo buněčných typů, volitelně v různých vývojových stadiích zvířete.

39. Použití transgenního zvířete kromě člověka pro identifikaci nových a/nebo specifických TAFs a/nebo faktorů interagujících s TAF.

40. Způsob identifikace a charakterizace různých transkripčních komplexů vyššího řádu v y z n a č u j í c í s e t í m, že TBP s epitopovou značkou, se kterým jsou transkripční komplexy vyššího řádu sdruženy, je izolován z transgenního zvířete.

41. Způsob charakterizace složení různých transkripčních komplexů vyššího řádu v y z n a č u j í c í s e t í m, že a) je zaveden transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22 do zvířete kromě člověka, b) je izolován TBP s epitopovou značkou z různých zvířecích tkání a/nebo různých buněčných typů zvířete, volitelně v různých vývojových stadiích

zvířete a c) je určeno složení transkripčních komplexů vyššího řádu.

42. Způsob identifikace nového a/nebo specifického TAF a/nebo faktoru interagujícího s TAF v y z n a č u j í c í s e t í m, že a) je zaveden transgen podle kteréhokoliv z nároků 11 až 22 do zvířete kromě člověka, b) je izolován TBP s epitopovou značkou z určité zvířecí tkáně a/nebo určitého buněčného typu zvířete, volitelně v určitém vývojovém stadiu zvířete a c) jsou disociovány a separovány TAF a/nebo faktor interagující s TAF sdružený s TBP s epitopovou značkou v transkripčním komplexu vyššího řádu a d) volitelně je určena aminokyselinová sekvence TAF a/nebo faktoru interagujícího s TAF.

43. Způsob izolace různých transkripčních komplexů vyššího řádu z transgenního zvířete kromě člověka podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že transkripční komplex vyššího řádu sdružený s TBP s epitopovou značkou je společně afinitně purifikován, když je TBP s epitopovou značkou afinitně purifikován pomocí alespoň jedné epitopové značky použité k označení TBP.

44. Způsob izolace transkripčního komplexu vyššího řádu podle nároku 43 v y z n a č u j í c í s e t í m, že TBP s epitopovou značkou je purifikován navázáním svého epitopu His na kolonu s Ni^{2+} .

45. Způsob izolace transkripčního komplexu vyššího řádu podle kteréhokoliv z nároků 43 a 44 v y z n a č u j í c í s e t í m, že TBP s epitopovou značkou je purifikován navázáním svého epitopu HA k protilátkám anti-HA.

20.05.98

63

46. Způsob izolace transkripčního komplexu vyššího řádu podle kteréhokoliv z nároků 43 až 45 v y z n a č u j í c í s e t í m, že transkripční komplex vyššího řádu je izolován pomocí afinitní kolony s protilátkami, které rozpoznávají epitop z TBP s epitopovou značkou, která má sekvenci s identifikačním číslem 17.

47. Protilátka, která rozpoznává epitop z TBP s epitopovou značkou, která má sekvenci s identifikačním číslem 17.