



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(51) SU (11) 1572419 A3

(51) 5 C 12 N 15/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 4202100/30-13

(62) 3935002/28-14

(22) 09.03.87

(23) 31.07.85

(31) Р 3505060.8

(32) 14.02.85

(33) DE

(46) 15.06.90. Бюл. № 22

(71) Берингер Ингельгейм Интернациональ ГмбХ (DE)

(72) Рудольф Гауптманн, Петер Мейндль
Эва Растль-Дворкин, Гюнтер Адольф,
Петер Светлы, Кристиан Пилер (AT)
и Норберт Гауэль (DE)

(53) 575.224.2:577.2 (088.8)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ
ПЛАЗМИДНОЙ ДНК рРНW11 или рРНW12,
КОДИРУЮЩЕЙ ОМЕГА-ИНТЕРФЕРОН

(57) Изобретение относится к генетической инженерии, в частности к конструированию рекомбинантных плазмидных ДНК для получения интерферонов. Плазмиду р9A2 или E79E9 переваривают рестриктазой Ava II, полученную

2
вставку к ДНК переваривают Sa и 3A, выделяют фрагмент длиной 189 п.о., плазмиду рER33 переваривают рестриктазами EcoR I и Pvu II, фрагмент длиной 389 п.о. далее переваривают энзимом Sa и 3A, выделяют фрагмент длиной 108 п.о., который лигируют с фрагментом длиной 189 п.о., полученную ДНК обрабатывают Hind III и лигируют с Hind III линейризованной плазмидой ER 103, полученной рекомбинантной ДНК трансформируют штамм E. coli HB 101, полученную при этом плазмиду рРНW 10 переваривают Bam HI, инкубируют в присутствии фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов, плазмиду обрабатывают энзимом Nco I, выделяют большой фрагмент Nco I - Alu I плазмиды р9A2 или E79E9, который получают в результате обработки плазмиды Ava II с последующим гидролизом Nco I и Alu I, рекомбинантной плазмидой ДНК трансформируют E. coli HB 101. 1 табл.

Изобретение относится к генетической инженерии, в частности к конструированию экспрессионных плазмид для получения интерферонов, а именно к способу конструирования экспрессионных плазмид рРНW11 и рРНW12, кодирующих новые интерфероны.

Способ осуществляют следующим образом.

Человеческую В-лимфобластную линию клеток, например Namalwa-клетки,

обрабатывают вирусом, например Sendai-вирус. Выделяют образовавшуюся из стимулированных Namalwa-клеток мРНК и используют ее в качестве матрицы для синтеза кДНК. Чтобы повысить выход специфических для интерферона последовательностей в процессе клонирования, мРНК-препарат разделяют в сахарах с градиентом плотности соответственно на различной длины индивидуальные мРНК-молекулы.

(51) SU (11) 1572419 A3

Предпочтительнее собирать (накапливать) мРНК в области около 12S (примерно 800 - 1000 оснований мРНК). В этой области седиментирует специфическая для α - и β -интерферонов мРНК. мРНК из этой области градиентов концентрируется благодаря осаждению и растворению в воде.

Составление библиотеки кДНК осуществляют известными методами. мРНК снабжают добавкой олиго-dt. Затем благодаря добавке четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) и фермента обратной транскриптазы в соответственно буферированном растворе в течение 1 ч при 45°C синтезируют кДНК. Благодаря экстракции хлороформом и хроматографии на колонке с гелем, например через сефадекс G50, очищают гибрид кДНК/мРНК. РНК гидролизуют благодаря обработке щелочью (0,3 моль NaOH при 50°C, 1 ч), и кДНК после нейтрализации с помощью кислого раствора ацетата натрия осаждают этанолом. После добавки дезоксинуклеозидтрифосфатов и *E. coli* ДНК-полимеразы-1 в соответствующий раствор осуществляют двухнитевой, (двойной) синтез, причем ДНК служит одновременно как матрица и как затравка благодаря образованию структуры типа шпильки на своем 3'-конце (6 ч при 15°C). После экстракции фенолом, хроматографии на сефадексе G50 и осаждения этанолом ДНК в пригодном растворе подвергают обработке специфической эндонуклеазой S I. При этом распадается структура шпильки, а также непрямая в двойную нить ДНК. После экстракции хлороформом и осаждения этанолом двухнитевую ДНК (ds ДНК) разделяют по величине в сахарах с градиентом плотности. Для следующей стадии клонирования предпочтительно применяют только ds ДНК размером 600 bp и более, чтобы повысить вероятность получения клонов, которые содержат комплектную кодирующую последовательность новых интерферонов. ds ДНК длиной более 600 bp концентрируют из градиентов путем осаждения этанолом и растворения в воде.

Для того, чтобы увеличить образовавшиеся ds ДНК-молекулы, их нужно сначала внести в соответствующий вектор, а затем в бактерию *E. coli*. Вектор представляет собой плазмиду pBR

322. Эта плазида состоит из репликона и двух селекционных маркеров. Они придают хозяину резистентность против антибиотиков ампициллина и тетрациклина (Ap^r , Tc^r). Ген для β -лактамазы (Ap^r) содержит последовательность для распознавания рестрикционной эндонуклеазы Pst I. pBR 322 можно разрезать с помощью Pst I. Выступающие 3'-концы удлиняются с помощью концевото фермента дезоксинуклеотидтрансферазы (TdT) при помещении dGTP в соответствующий буферированный раствор. Одновременно также на 3-концах удлиняется ds ДНК с помощью фермента TdT при применении dCTP. Гомополимерные концы плазмиды и ds ДНК смешивают в соответствующих концентрационных соотношениях и при пригодных условиях температуры, солевых и буферных условиях.

E. coli штамм HB 101 (генотип F-, hsdS 20 (r-B, m-B) rec A13, ara-14, proA2, lacV1, galK2, rpsL120 (Smr), хуI-5, mtl-1, supE44, lambda-) обрабатывают путем выращивания в $CaCl_2$. Компетентный *E. coli* HB 101 смешивают с ДНК и после инкубации при 0°C трансформируют полученной плазмидной ДНК путем теплового нагрева при 42°C в течение 2 мин. Затем трансформированные бактерии помещают на содержащие тетрациклинагаровые пластинки (10 мкг на 1 мл). На этом агаре могут расти только *E. coli* HB 101, которые восприняли векторную или рекомбинантную векторную молекулу (Tc^r). Рекомбинантные вектор-ds ДНК-молекулы передают хозяину генотип $Ap^r Tc^r$, так как благодаря введению ds ДНК в β -лактамазген разрушается информация для β -лактамазы. Клоны переносят на агаровые пластинки, которые содержат 50 мкг/мл ампициллина. Растет только примерно 3%, что означает, что 97% клонов содержат вставку dsДНК-молекулы. Из них 28600 клонов переносят индивидуально в лунки (выемки) пластинок для микротитрования, которые содержат питательную среду, 10 мкг/мл тетрациклина и глицерина. После того, как клоны увеличиваются в них, пластинки хранят при -70°C (кДНК-библиотека).

Клоны после размораживания переносят на нитроцеллюлозные фильтры. Эти фильтры расположены на содержащем тетрациклин питательном агаре. После

увеличения колоний бактерий ДНК бактерии фиксируют на фильтре.

В качестве образца служит предпочтительно вставка клона pER33, которая содержит ген для IFN- α -2-Arg. Благодаря нитроцеллюлозе этот кусок ДНК радиоактивно маркируют, причем применяется ДНК-полимераза I, dATP, dGTP, dTTP и α - 32 P-dCTP. Нитроцеллюлозные фильтры при пригодных нестрогих условиях гибридизации предварительно прежде всего обрабатывают без добавки радиоактивного образца и затем гибридизируют примерно в течение 16 ч при добавке радиоактивного образца. После этого фильтры промывают также в нестрогих условиях. Благодаря низкой строгости (точности) гибридизации и промывки охватывают не только содержащие интерферон- α -2-Arg-клоны, но также другие интерферонсодержащие клоны, последовательности которых могут заметно отклоняться от последовательностей до сих пор известного интерферона- α . После высушивания фильтры экспонируют на рентгеновской пленке. Почернение, которое четко находится над уровнем фона, показывает наличие клона со специфическими интерферону последовательностями.

Так как сигналы радиоактивности имеют различное качество, то положительные клоны, подозреваемые как положительно реагирующие клоны, выращивают в маленьком масштабе. Плазмидную ДНК-молекулы изолируют, переваривают с рестрикционной эндонуклеазой Pst I и разделяют по размеру электрофоретически на агаровом геле (геле агарозы) ДНК в геле агарозы (агаровом геле) по методу Саутерна переносят на нитроцеллюлозный фильтр. ДНК этого фильтра гибридизируют с помощью радиоактивного, содержащего IFN-ген, денатурированного образца. В качестве положительного контроля служит плазида IF7 (хранится в DS M под номером 2362), содержащая ген для интерферона α -2-arg. Ауторадиограмма четко показывает что клон F76E9 и клон P9A2 содержат последовательность, которая гибридизируется при нестрогих условиях с помощью гена интерферона α -2-Arg. Для того, чтобы подробнее охарактеризовать ds ДНК-вставку клона E76E9 и клона P9A2, плазмиды этих клонов готовят в большем масштабе. ДНК переваривают различными рестрикционными

эндонуклеазами, например с AluI, Sau 3A, Bg III, Hinf I, Pst I и Hae III. Образовавшиеся фрагменты разделяют в агаровом (агарозном) геле. Благодаря сравнению с соответствующими маркерами величин, например с фрагментами, которые образуются путем переваривания pBR 322 с рестрикционной эндонуклеазой Hinf I, соответственно HaeIII, определяют размеры фрагментов. Определяют последовательность этих фрагментов. Сделан вывод, что в случае вставки клонов E76E9 и P9A2 речь идет о до сих пор неизвестных интерферонгенах, а именно о омега-интерферонах.

Информацию об омега-интерферонах используют для того, чтобы переварить кДНК-ставку с рестрикционными эндонуклеазами. Образовавшиеся фрагменты лигируют в ds ДНК-форму (репликативная форма) M13 mp9 и секвенсировать с помощью дидеокси-метода Sanger. Однонитевую ДНК рекомбинантных фагов изолируют. После связывания синтетического олигомера в четырех отдельных приготовлениях осуществляют двухнитевые синтезы при применении большого фрагмента ДНК-полимеразы I из E.coli (фрагмент Кленова). В каждой из четырех частичных реакций добавляют один из четырех дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP; ddCTP; ddGTP; ddTTP). Это приводит к статистически распределенным обрывам цепи в тех местах, на которых в матрице ДНК находится дополнительное к соответствующему дидезоксинуклеозидтрифосфату основание. Кроме того, дополнительно используют радиоактивно маркированный dATP. По окончании реакции синтеза продукты денатурируют и одонитевые ДНК-фрагменты разделяют по величине в денатурирующем полиакриламидном геле. После этого гель экспонируют на рентгеновской пленке. Из ауторадиограммы можно определить ДНК-последовательность рекомбинантного M13 фага. Последовательность вставки различных рекомбинантных фагов определяют с помощью пригодной компьютерной программы.

Изолированная кДНК клона E76ED для омега (Glu)-интерферона длиной 858 пар оснований имеет 3'-нетранслируемую область. Область, которая кодирует зрелый омега (Glu)-интерферон,

ДНК-последовательность, кодирующая омега-интерферон, полностью содержится в клонах Е76Е9 и Р9А2. Они начинаются на N-терминальном конце аминокислот цистеин-аспарагиновая кислота - лейцин. Оба зрелых омега-интерферона имеют длину 172 аминокислоты, что четко отклоняется от длин обоих известных интерферонов, например 166 (соответственно 165) аминокислот в случае α -интерферонов. Оба оме-

Сравнение обоих омега-интерферонов с до сих пор известным человеческим α -интерфероном дает следующую картину (см. таблицу).

Характеристика	Омега	Альфа
Длина протеина в аминокислотах	172	166*
Потенциальное место N-гликозирования в положении	78	—**

ACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTAAGCTTAAAG ATG 116
RBS HindIII

Cys Asp

TGT GAT C
Sau3A

IFN - omega - Ceu →

I. Получение необходимых для этой цели отдельных фрагментов ДНК.
Фрагмент а.

Для получения фрагмента а плазмиды, которая содержит ген для IFN-омега, например плазмиду P9A2, перева-

ривают с рестрикционной эндонуклеазой AvaII. После хроматографии и очистки полученной кДНК-вставки ее переваривают с рестрикционными эндонуклеазами NcoI и AluI двукратно и после этого изолируют с помощью хроматографии и электроэлюирования. Этот фрагмент содержит большую часть соответствующего омега-интерферогена. Так, например, омега (Gly)-интерфероген клона P9A2 имеет следующую структуру:

5	10	15	
His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu CncoI CAT GCC CTA CTT AGC			
AGG AAC ACC TTG 28			
20	25	30	
Val Leu Leu His	Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Leu		
GTG CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT CTC		73	
35	40	45	
Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys Gly			
AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA GGG		118	
50	55	60	
Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met			
AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAG ATG		163	
65	70	75	
Leu Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala			
CTG CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC TCC TCT GCT		208	
80	85	90	
Ala Trp Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu His			
GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT CAT		253	
95	100	105	
Gln Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly			
CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG GGA		298	
110	115	120	
Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu			
GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC TTG		343	
125	130	135	
Ar Ar Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys			
AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA CAG AAG AAA		388	
140	145	150	
Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met Lys			
TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA		433	
155	160	165	
Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys			
TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAG ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA		478	
170			
Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser			
GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT TGAAATGATTCTCATTGATTAATTTGCCATA		530	

TAACACCTGGCAGATGTG ACTCTGGTCAATTC AAAACACCTCTCATTCGGCTTAAATCAG 589
 AGAATGAGTGAATTAGTTCTGCAAATACTTTGTCCGTATATTAAGCCAGTATATGTTA 648
 AAAAGACTTAGGTTTCAGGGGCATCAGTCCCTAAGATGTTATTTATTTTACTCATTAT 707
 TTATTCTTACATTTTATCATATTTATACTATTIATATCTTATATAACAATGTTTGCC 766
 TTTACATTGTATTAAAGATAACAAAACATGTTTCAGct 802
 AluI

Фрагмент б

Для получения фрагмента б плазмиду Р9А2 переваривают с рестрикционной эндонуклеазой AvalI. После хроматографии и очистки полученной кДНК-

15 вставки ее переваривают далее с рестрикционной эндонуклеазой Sau3A и желательной длиной 189 бп фрагмент изолируют с помощью хроматографии и электроэлюирования. Он имеет следующую структуру:

5 10 15
 Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu
 Sau3A GAT CTG CCT CAG AAC CAT CGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC TTG 42
 20 NcoI 25 30
 Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Leu
 GTG CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TIG TGT CTC 87
 35 40 45
 Lys Asp Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys Gly
 AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA GGG 132
 50 55 60
 Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met
 ACG CAG TTG CAG AAG GGC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAC ATG 177
 Leu Gln Gln Ile
 CTG CAG CASau3Ag atc 189

Фрагмент с.

Для получения фрагмента с плазмиду рЕР 33 двукратно переваривают с рестрикционными ферментами EcoRI и PvuII. Полученный после фракционирования на агаровом (агарозном) геле и очистки фрагмент длиной 389 бп, который содержит Trp-промотор, рибо-

40 сомальное место связывания и стартовый (инициирующий) кодон, затем переваривают с Sau3A. Желательный фрагмент длиной 108 бп получают путем электрофореза на агаровом (агарозном) геле, электроэлюирования и очистки на колонке Elutip. Он имеет следующую структуру:

EcoRI Sau3A
 gaattcacgct GATCGCTAAACATTGTGCAAAAAGACGGCTTGACTTTGCCTTGCCGA 59
 ACCAGTTAACTAGTACACAAGTTTCACGGCAACGGTAAGCAGCTTTAAGCITAAAG ATG 116
 RBS Hind III
 Cys Asp
 TGT gatc
 Sau3A 123

Лигирование фрагментов б и с.
Фрагменты б и с лигируют T4-лига-
зон и после разрушения фермента раз-

резают с помощью Hind III. Этот лиги-
рованный фрагмент имеет следующую
структуру:

Hind III		5		
	Sau3A		NcoI	
a AGCTTAAAG	ATGTGTGATC	TGCCTCAGAA	CCATGGCCTA	CTTAGCAGGA 50
ACACCTTGCT	GCTTCTGCAC	CAAATGACCA	GAATCTCCCC	TTTCTTGTGT 100
CTCAAGGACA	GAAGAGACTT	CACGTTCCCC	CAGGAGATGG	TAAAAGGGAG 150
CCAGTTGCAG	AAGGCCCATG	TCATGTCTGT	CCTCCATGAG	ATGCTGCAGC 200
AGATCACACA	TCTTTAagct			
Sau3A	Hind III			

Этот необходимый для получения
плазмиды pRHW10 ДНК-фрагмент можно
также приготовить путем применения
двух синтетически полученных олиго-
нуклеотидов:

Олигонуклеотид формулы
ACCTTAAACATCTCT-3' оставляют дефосфо-
рированным на своем 5'-конце.
Олигонуклеотид формулы 5'-
GATCAGACATCTTTA-3', киназируют на 5'-
конце с помощью T₄-починуклеотидкиназы
и АТР. При гибридизации обоих олиго-
нуклеотидов получают следующий короткий
ДНК-фрагмент:

5'- AGCTTAAAGATGTGT 3'
3'- ATTTCTACACACTAGp 5'

Благодаря этому на конце образуется
типичный для Hind III 5-переход и
на другом конце - типичный для Sau3A
5-переход.

Фрагмент б дефосфорилируют при при-
менении фосфатазы из телячьего ки-
шечника. Фрагмент б и вышеописанный
фрагмент собирают вместе и связывают
друг с другом с помощью T₄-лигазы.

Так как лигазе необходим по край-
ней мере один содержащий 5'-фосфат
конец, можно связать только кусок син-
тетической ДНК с фрагментом б или
два синтетических фрагмента по их
Sau 3A-концам. Так как оба получен-
ных в результате фрагмента различают-
ся по своей длине, их можно разделять
путем селективного осаждения изопро-
панолом. Таким образом, очищенный
фрагмент фосфорилируют с помощью T₄-
полинуклеотидкиназы и АТР.

Пример 2.

II. Получение экспрессионных плаз-
мид.

а. Получение плазмиды pRHW10.

Линеаризируют экспрессионную плаз-
миду pER 103 с помощью Hind III и
затем обрабатывают фосфатазой те-
лячьего кишечника. После изолирова-
ния и очистки таким образом получен-
ную ДНК дефосфорилируют и после это-
го лигируют с помощью лигированных
фрагментов б и с (после их перевари-
вания с Hind III). Затем E. coli
HB 101 трансформируют полученной пос-
ле лигирования смесью и культивируют
на LB-агаре плюс 50 мкг/мл ампицил-
лина. Обладающая желательной струк-
турой плазида получила название
pRHW10, которая после его репликации
служила в качестве промежуточного про-
дукта для получения дальнейших плаз-
мид.

б. Получение плазмиды pRHW12.

К разрезанной с помощью Bam HI
плазмиде pRHW10 добавляют фрагмент
Кленова ДНК-полимеразы I и 4 дезокси-
нуклеозидтрифосфата. Полученную после
инкубации линеаризованную и снаб-
женную тупыми концами плазмиду очища-
ют и затем разрезают с помощью NcoI.
Большой фрагмент, который получает-
ся с помощью электрофореза на агаро-
вом (агарозном) геле, электроэлюиро-
вания и Elutip-очистки по типу элю-
ирования, лигируют с помощью фрагмен-
та а. Затем смесь после лигирования
трансформируют в E. coli HB 101 и
культивируют на LB-агаре плюс 50 мкг/мл
ампициллина. Обладающая желательной
структурой плазида получила назва-
ние pRHW12, 1 л полученной таким об-
разом инкубированной бактериальной
культуры (оптическая плотность 0,6
при 600 нм) содержит 1 · 10⁶ междуна-
родных единиц интерферона.

в. Получение плазмиды pRHW11.

К разрезанной с помощью Bam HI плазмиде pRHW10 добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I и 4 дезоксирибонуклеозидфосфата. Полученная после инкубации линейаризированная, снабженная линейными концами плазида очищается и затем разрезается с помощью NcoI. Большой фрагмент, который получается с помощью электрофореза в агарозном геле, электроэлюирования и Elutip-очистки (по типу элюирования), лигируется с помощью полученного аналогично из плазмиды E79E9 фрагмента а, в котором лишь кодирующий III аминокислоту - (Gly) GGG-кодон заменен на GAG-кодон (Glu). Затем полученной после лигирования смесью трансформируют *E. coli* HB 101 и культивируют на LB-агаре. Обладая желательной структурой плазида, получила название pRHW11. pRHW11 экскретирует желательный омега-(Gly)-интерферон.

Пример 1. Нахождение специфических к IFN-последовательности клонов.

а. Приготовление кДНК-библиотеки.

мРНК из стимулированных вирусом Sendai-клеток применяют в качестве исходного материала для приготовления кДНК-банка по известным из литературы методам. Образовавшиеся 30000 клонов переносят индивидуально в углубления (лунки) пластин для микротитрования. Используют следующую среду для роста и замораживания колоний: 10 г триптона; 5 г дрожжевого экстракта; 5 г NaCl; 0,51 г цитрата натрия $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$; 7,5 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$; 1,8 г KH_2PO_4 ; 0,09 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,9 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 44 г глицерина; 0,01 г тетрациклин HCl; вода до 1 л.

Для микротитрования пластины с индивидуальными клонами инкубируют в течение ночи при 37°C и затем хранят при -70°C .

б. Гибридизирующая проба (образец).

В качестве исходного материала гибридизирующего образца служит рекомбинантная плазида pBR 33. Эта плазида содержит кодирующую область для зрелого интерферона IFN-2 arg плюс 190 оснований 3'-нетранслированной области. 20 мкг pBR 33 инкубируют в течение 1 ч при 37°C с 30 ед. Hind III рестрикционной эндонуклеазы в

200 мкл реакционного буфера (10 mM трис-HCl, pH 7; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM дитиотрейтода (DTT); 50 mM NaCl). Реакцию прекращают добавлением 1/25 объема 0,5 M этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и прогревают при 70°C в течение 10 мин. После добавления 1/4 объема 5x буфера (80% глицерина; 40 mM трис-уксусной кислоты, pH 7; 8; 50 mM EDTA, 0,05% додецилсульфата натрия (SDS); 0,1% бромфенолового синего) образовавшиеся фрагменты разделяют по величине в 1%-ном агарозном геле (гель-буфер и электродный буфер (TBE): 10,8 г/л трис-гидроксиметиламинометана (трис-основания); 5,5 г/л борной кислоты; 0,93 г/л EDTA). После инкубации геля в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) участок геля, который содержит фрагмент ДНК с геном IFN (длиной примерно 800 bp), вырезают. ДНК электроэлюируют в 1/10x TBE-буфере. Раствор ДНК экстрагируют однократно фенолом и четырехкратно эфиром и ДНК осаждают добавлением 1/10 объема 3 M ацетата натрия (Na AC), pH 5,8, и 2,5 объемами этанола при -20°C . Осадок ДНК промывают однократно 70%-ным этанолом и высушивают в течение 5 мин в вакууме. ДНК растворяют в 50 мкл воды (примерно 50 мкг/мкл). Эту ДНК метят методом перемещения разрыва:

50 мкл реакционной смеси содержит 50 mM трис-HCl; pH 7,8; 5 mM MgCl_2 ; 10 mM меркаптоэтанол; 100 нг ДНК-вставки pBR 33, 16 нг DNaSeI; 25 мкм dATP; 25 мкм dGTP; 25 мкм dTTP; 20 мкмCi [$\alpha^{32}\text{-P}$]-dCTP (более 3000 Ci/ммоль), а также 3 ед. ДНК-полимеразы I (*E. coli*). Реакцию проводят при 14°C в течение 40 мин. Реакцию заканчивают добавлением 1 объема раствора, содержащего 50 mM EDTA; 2% SDS; 10 mM трис-HCl, pH 7,6, и прогревают при 70°C в течение 10 мин. ДНК отделяют путем хроматографии через сефадекс G 100 в TE-буфере (10 mM трис-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) от не включенной радиоактивности. Радиоактивно меченный образец (проба) имеет удельную активность примерно 4×10^7 cpm/мкг.

в. Скрининг клонов на содержание вставок гена IFN.

Вмороженные в микротитр-пластины бактериальные культуры оттаивают (а). Кусок нитроцеллюлозного фильтра соот-

ветствующего размера (размер пор 0,45 мкм) помещают на LB-агар (LB-агар: 10 г/л триптона; 5 г/л дрожжевого экстракта; 5 г/л NaCl; 15 г/л бакто-агара; 20 мг/л тетрациклин-HCl). С помощью приспособленного к микротитропластинкам штампа индивидуальные клоны переносят на нитроцеллюлозный фильтр. Бактерии выращивают в течение ночи при 37°C до больших (диаметром примерно 5 мм) колоний. Для разрушения бактерий и денатурирования ДНК нитроцеллюлозные фильтры помещают по очереди на стопку пропитанных следующими растворами фильтров из ватмана 3ММ: 1 - на 8 мин в 0,5 М NaOH; 2 - на 2 мин в 1 М трис-HCl, pH 7,4; 3 - на 2 мин в 1 М трис-HCl, pH 7,4, и 4 - на 4 мин в 1,5 М NaCl, 0,5 М трис-HCl, pH 7,4. Фильтры высушивают на воздухе и затем выдерживают 2 ч при 80°C. Предварительную обработку фильтров осуществляют в течение 4 ч при 65°C в растворе для гибридизации, состоящем из 6х SSC (1х SSC соответствует 0,15 М NaCl, 0,015 М тринатрийцитрата, pH 7,0), 5х раствора Денхардта (1х раствор Денхардта соответствует 0,02% PVP (поливинилпирролидон); 0,02% Ficoll (молекулярный вес 400000); 0,02% BSA (альбумин бычьей сыворотки) и 0,1% SDS (додecilсульфата натрия). На фильтр берут примерно $1 \cdot 10^6$ срм пробы, приготовленной согласно (б), денатурируют кипячением и добавляют в гибридизационную смесь. Гибридизацию проводят в течение 16 ч при 65°C. Отмывку фильтра осуществляют при 65°C четырехкратной промывкой в течение 1 ч в буфере 3х SSC/0,1% SDS. Фильтры высушивают на воздухе, покрывают тонкой пленкой и экспонируют на пленке Kodak X-Omats.

Пример 2. Перенос по Саузерну для подтверждения наличия IFN-гена в рекомбинантных плазмидах.

Из колоний, дающих положительный сигнал при радиоавтографии, выращивают культуры объемом 5 мл в течение ночи при 37°C в LB-среде (10 г/л триптона; 5 г/л дрожжевого экстракта; 5 г/л NaCl; 20 мг/л тетрациклина х HCl). Плазмидную ДНК выделяют по Birnboim и Doly. 1,5 мл суспензии клеток центрифугируют и суспендируют при 0°C в 100 мкл лизисного раствора, состоящего из 50 мМ глюкозы;

- 10 мМ EDTA; 25 мМ трис-HCl, pH 8,0, и 4 мг/мл лизоцима. Инкубируют 5 мин при комнатной температуре, добавляют 2 объема охлажденного льдом раствора (0,2 М NaOH и 1% SDS), инкубируют еще 5 мин, затем добавляют 150 мкл охлажденного льдом раствора ацетата калия, pH 4,8, и инкубируют в течение 5 мин. Образовавшийся осадок отделяют на центрифуге. Раствор ДНК экстрагируют 1 объемной частью смеси фенола с CHCl₃ (1:1), ДНК осаждают добавлением 2 объемов этанола.
- 15 После осаждения на центрифуге осадок в пробирке промывают однократно 70%-ным этанолом и высушивают в течение 5 мин в вакууме. ДНК растворяют в 50 мкл (TE)-буфера. 10 мкл полученного раствора добавляют в 50 мкл реакционного буфера (10 мМ трис-HCl, pH 7,5; 10 мМ MgCl₂; 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ), переваривают вместе с 10 ед. PstI-рестрикционной эндонуклеазы в течение 1 ч при 37°C. Затем добавляют 1/25 объема 0,5 М EDTA; 1/4 объема 5х буфера, прогревают 10 мин при 70°C ДНК разделяют электрофоретически в 1%-ном агарозном геле (TBE-буфер).
- 30 ДНК из агарозного геля по методу Саузерна переносят на нитроцеллюлозный фильтр. ДНК в геле денатурируют в течение 1 ч раствором 1,5 М NaCl/0,5 М NaOH. Затем в течение часа нейтрализуют раствором 1 М трис х HCl, pH 8 (1,5 М NaCl). ДНК переносят в 10х SSC (1,5 М NaCl; 0,15 М цитрата натрия; pH 7,0) на нитроцеллюлозный фильтр. После полного переноса (примерно 16 ч) фильтр быстро споласкивают в 6х SSC-буфере, затем высушивают на воздухе и после этого прогревают в течение 2 ч при 80°C. Затем фильтр обрабатывают при 65°C в течение 4 ч с помощью 6х SSC/5х раствор Денхардта/0,1% SDS. Примерно $2 \cdot 10^6$ срм гибридизационной пробы денатурируют нагреванием до 100°C и затем вносят в раствор для гибридизации. Продолжительность гибридизации составляет 16 ч при 65°C.

Пример 3. Обнаружение интерфероновой активности в клоне E76E9.

- 100 мл культуры клона E76E9 выращивают в LB-среде (см. пример 2) при 37°C до оптической плотности $A_{600} = 0,8$. Бактерии отделяют на центрифуге в течение 10 мин при скорости 7000 об/мин, промывают однократно

раствором 50 мМ трис х HCl, pH 8,0, — 30 мМ NaCl, суспендируют в 1,5 мл промычного раствора. Инкубируют с 5 мг/мл лизоцима при 0°C в течение 5 мин, лизиса, бактериальную суспензию пятикратно замораживают и оттаивают. Остатки разрушенных клеток осаждают путем центрифугирования в течение 1 ч при 40000 об/мин. Надосадочную жидкость стерильно отфильтровывают и испытывают на интерфероновую активность. В качестве теста применяют бляшку редукционного теста с V3-клетками и вирус Vesicular Stomatitis. Клон продуцирует до 9000 IV (международных единиц) интерферона на 1 л исходной культуры.

Пример 4. Получение экспрессивной плазмиды pRHW12 и экспрессивной плазмиды pRHW11.

а. Получение плазмиды pRHW10.

100 мкг плазмиды P9A2 гидролизуют со 100 ед. рестрикционной эндонуклеазы *Ava*II. После гидролиза фермент инактивируют путем нагревания при 70°C и полученные фрагменты разделяют в 1,4%-ном агарозном геле с TBE-буфером соответственно размеру. Полосу, которая содержит всю кДНК-вставку, электроэлюируют и очищают на *Elutip*-колонке. Из полученных 20 мкг 6 мкг далее гидролизуют с рестрикционной эндонуклеазой *Sau*3A (20 ед. в 100 мкл раствора). Фрагменты разделяют в 2%-ном агарозном геле в TBE-буфере. После окрашивания с помощью этидийбромид (EtBr) электроэлюируют кусок ДНК длиной 189 бп и очищают аналогично описанному.

Для того, чтобы ген интерферона связать с промотором, местом связывания рибосомы и стартовым кодоном, соответствующий кусок ДНК изолируют из экспрессирующей плазмиды pER 33. Для этой цели 50 мкг pER 33 двукратно гидролизуют рестрикционными ферментами *Eco*RI и *Pvu*II, полученные фрагменты фракционируют соответственно их размеру в 1,4%-ном агарозном геле в TBE-буфере. Кусок ДНК длиной 389 бп, который содержит T_gp-промотор, место связывания рибосомы и стартовый (инициирующий) кодон, электроэлюируют и очищают с помощью *Elutip*-колонки. Полученный фрагмент затем гидролизуют с *Sau*3A и получают требуемый фрагмент длиной 108 бп путем электрофореза в агарозном геле, элект-

роэлюирования и очистки на колонке *Elutip* с выходом примерно 100 нг.

20 нг фрагмента δ лигируют при 14°C в течение 18 ч с 20 нг фрагмента δ в объеме 40 мкл при применении 10 ед. T₄-лигазы в растворе, который содержит 50 мМ трис-HCl, pH 7,5; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ DTT и 1 мМ АТР. Затем фермент инактивируют путем нагревания до 70°C и полученную ДНК разрезают *Hind* III в объеме 50 мкл.

10 мкг экспрессивной плазмиды pER 103 линейаризируют с помощью *Hind* III в объеме 100 мкл. Инкубируют 2 ч при 37°C, добавляют 1 объем 2-фосфатазного буфера (20 мМ трис-HCl, pH 9,2; 0,2 мМ EDTA) вместе с 1 ед. фосфатазы телячьего кишечника (CIP). После 30 мин при 45°C добавляют следующую единицу CIP и инкубируют еще раз в течение 30 мин. Полученную таким образом ДНК очищают двукратной фенольной экстракцией, однократной экстракцией CHCl₃, осаждают добавлением 1/10 объема 0,3 М ацетата натрия (pH 5,5) и 2,5 объемами этанола.

100 нг линейаризованного pER 103 и лигированных фрагментов δ и δ (после *Hind* III-гидролиза) вносят в 100 мкл раствора, содержащего лигазный буфер, и лигируют при 14°C в течение 18 ч с помощью T₄-ДНК-лигазы.

200 мкл компетентной *E. coli* HB 101 смешивают с 20 мкл лигирующей смеси и инкубируют в течение 45 мин на льду. Затем поглощение ДНК полностью прекращают тепловым нагревом в течение 2 мин при 42°C.

Суспензию клеток инкубируют 10 мин на льду и наносят на LB-агар, содержащий 50 мг/л ампициллина. Из полученных 24 колоний выделяют плазмидную ДНК по методу Birnboim и Doly. После гидролиза с различными рестрикционными ферментами плазмиды имеет желательную структуру. Она получила название pRHW10.

б. Получение плазмиды pRHW12.

Примерно 10 мкг плазмиды pRHW10 разрезают *Bam* HI, затем добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I и 4 дезоксинуклеозидтрифосфата и инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре. Полученную линейаризованную плазмиду с тупыми концами очищают фенольной экстракцией и осаждают спиртом. После этого разрезают рестрикционной эндонуклеазой *Nco*I в

объеме 100 мкл. Большой фрагмент получают путем электрофореза в агарозном геле, электроэлюирования и очистки на Elutip. Фрагмент α получают путем гидролиза 4 мкг *Ava*II-фрагмента, который содержит P9A2-кДНК-вставку, с *Nco*I и *Alu*I, причем получают примерно 2 мкг фрагмента.

В последней стадии лигирования фрагмент α и добавленный к нему двукратно гидролизированный *Bam*HI/*Nco*I *p*RHW10 лигируют в объеме 10 мкл, причем каждой ДНК используют по 10 нг. Лигирование достроенного *Bam*HI-сайта рестрикции *Alu*I дает снова *Bam*HI-сайт рестрикции.

Полученной после лигирования смесью трансформируют компетентные клетки *E. coli* HB 101 аналогично описанному. Из полученных 40 колоний выбирают одну, она получила название *p*RHW12.

Плазмиду изолируют и *Eco*R I/*Bam*HI-вставку секвенируют дидезокси-методом. Плазида имеет ожидаемую последовательность.

в. Получение плазмиды *p*RHW11.

Осуществляют аналогично примеру 46. 1 мкг плазмиды *p*RHW10 гидролизуют *Bam*HI. Острые концы полученных ДНК делаются тупыми с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и 4 дезоксинуклеозидтрифосфатов, затем линеаризованную ДНК разрезают с помощью *Nco*I. Большой фрагмент получают электрофорезом в агарозном геле, электроэлюированием и колоночной хроматографией по типу элюирования.

*Nco*I-*Alu*I-фрагмент выделяют из клона E76E9 аналогично примеру 46. Затем 10 нг векторной части лигируют с 10 нг кДНК-части в объеме 10 мкл в соответствующих условиях и при применении 1 ед. T_4 -лигазы. Полученной смесью ДНК трансформируют *E. coli* HB 101. Селекцией полученных 45 колоний на содержащих ампициллин LB-чашках выбирают клон, который обозначают *p*RHW11. Выращивают соответствующий клон, выделяют плазмидную ДНК. Ее структуру подтверждают наличием нескольких специфических мест разреза рестрикционной эндонуклеазой (*Alu*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Pst*I).

г. Экспрессия интерфероновой активности клетками *E. coli* HB 101, содержащими плазмиду *p*RHW12.

100 мл бактериальной культуры инкубируют до оптической плотности 0,6 при 600 нм в минимальной среде M9, которая содержит все аминокислоты за исключением триптофана (20 мкг/мл на аминокислоту); 1 мкг/мл тиамина; 0,2% глюкозы и 20 мкг/мл индол-(3)-актиловой кислоты (IAA), индуктор триптофан-оперона. Затем бактерии осаждают путем центрифугирования (10 мин при 7000 об/мин), промывают однократно буфером 50 мМ трис-HCl, pH 8; 30 мМ NaCl, суспендируют в 1,5 мл этого же буфера. Инкубируют в течение 30 мин с 1 мг/мл лизоцина на льду, бактерии 5 раз замораживают и оттаивают. Обломки клеток удаляют центрифугированием в течение 1 ч при 40000 об/мин. Надосадочную жидкость стерильно фильтруют и испытывают на интерфероновую активность в анализе по методу уменьшения пятна при применении человеческих A549 клеток и *Encephalomyocarditis*-вируса.

Результат: 1 л приготовленной бактериальной культуры содержит $1 \cdot 10^6$ международных единиц интерферона.

30 Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения рекомбинантной плазмидной ДНК *p*RHW11 или *p*RHW12, кодирующей омега-интерферон, включающий обработку плазмиды P9A2 или E79E9 эндонуклеазой *Ava*II, выделение вставки кДНК, обработку полученного фрагмента эндонуклеазой *Sau*3A с последующим выделением фрагмента размером 189 п.о., обработку плазмиды энзимами *Eco*RI и *Pvu*II, обработку полученного фрагмента размером 389 п.о., содержащего *trp*-промотор, место рибонного связывания и стартовый кодон, эндонуклеазой *Sau*3A, выделение фрагмента размером 108 п.о., лигирование полученного фрагмента с фрагментом размером 189 п.о. с помощью ДНК-лигазы, обработку полученной плазмидной ДНК эндонуклеазой *Hind*III, дефосфорилирование, лигирование полученных фрагментов, трансформирование рекомбинантными плазмидными ДНК штамма бактерий *E. coli* HB 101, культивирование штамма, выделение плазмиды *p*RHW10, обработку плазмиды *p*RHW10 эндонуклеазой *Bam*HI, инкубирование в присутствии фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и четырех дезоксинукле-

озидтрифосфатов, обработку эндонукле-
азой NcoI с последующим выделением
большого фрагмента плазмиды pRW10,

которая в HindIII-сайте плазмиды pER
103 содержит ДНК фрагмент со следую-
щей нуклеотидной последовательностью:

HindIII	SauA	NcoI	
aACCTTAAAG	ATGTGTGATC	TGCCTCAGAA	CCATGGCCTA CTAGCAGGA 50
ACACCTTGGT	GCTTCTGCAC	CAAATGACCA	GAATCTCCCC TTTCTTGTGT 100
CTCAAGGACA	GAAGAGACTT	CAGGTTCCCC	CAGGAGATGG TAAAAGGGAG 150
CCAGTTGCAG	AAGGCCCATG	TCATGTCTGT	CCTCCATGAG ATGCTGCAGC 200
ACATCACACA	TCTTT ^A agctt		
Sau3A	HindIII		

лигирование полученного фрагмента с
фрагментом NcoI-AluII плазмиды P9A2
или E79E9, полученные путем перевари-
вания плазмиды эндонуклеазами, обра-

ботку полученной вставки кДНК энзима-
ми NcoI и AluI со следующей нуклео-
тидной последовательностью:

CAT GGG	CTA CTT AGC AGC AAC ACC TTG	28
NcoI		
GTG CTT CTG CAC CAA ATC AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT CTC		73
AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA GGG		118
AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAG ATG		163
CTG CAG CAC ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC TCC TCT GCT		208
GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT CAT		252
CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG GGA		298
GAA GGA GAA TCT GCT CXG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC TTG		343
AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA		388
TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA		433
TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA		478
CAT AGA GAC CTG CGC TCA TCT TGAAATGATTCTCATTGATTAATTTGCCATA		530
TAACASTTGCACATGTGACTCTGGTCAATTCAAAAGACTCT TATTTCCG CTTTAATCAG		589
ACAATTGACTGAATTAGTTGTCCAAATACCTTTGTGGTATATTAAGCCAGTAATGTTA		648
AAAAGACTTAGGTTCAAGGGCATCAGTCCCTAAGATGTTATTTATTTTACTCATTAT		707
TTATTCTTACATTTTATCATATTTATACTATTATTTATATAACAAATGTTTGCC		766
TTTACATTGTATTAACATAACAAAACATCTTCAGct		802
AluI		

где X - нуклеотид С или А,
хроматографии, лигирования и трансфор-
мации штамма бактерий E. coli HB 101

рекомбинантной плазмидной ДНК с пос-
ледующим выделением целевого продукта.

50

Составитель Н. Кузенкова	
Редактор М. Петрова	Техред М. Дидык
	Корректор Н. Король

Заказ 1524	Тираж 498	Подписное
РНИИП Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР		
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5		

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101