



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

216 069 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 00674
(22) A bejelentés napja: 1990. 08. 28.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/399,874 1989. 08. 29. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/04840
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/03550

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/62

C 12 P 21/02

C 12 N 15/17

(40) A közzététel napja: 1992. 08. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1999. 04. 28.

(72) Feltalálók:

dr. Habermann, Paul, Eppstein/Taunus (DE)
Seed, Brian, Boston, Massachusetts (US)
Stengelin, Siegfried, Hofheim/Taunus (DE)
dr. Uhlmann, Eugen, Glashütten/Taunus (DE)
Ulmer, Wolfgang, Eppstein/Taunus (DE)

(73) Szabadalmazók:

The General Hospital Corp., Boston,
Massachusetts (US)
Hoechst Ag., Frankfurt/Main (DE)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Eljárás fúziós fehérjék előállítására

KIVONAT

A találmány szerinti eljárással valamely kívánt fehérjét és egy ballasztrészt tartalmazó fúziós fehérjét állítanak elő oly módon, hogy

a) a ballasztrészt kódoló kevert oligonukleotidot állítanak elő, ahol az oligonukleotid DNS-szekvenciája (kódolószál)

(DCD)_x

részt tartalmaz, ahol

D jelentése A, G vagy T és

x értéke 4–12,

és ahol az oligonukleotid legfeljebb 100 nukleotidot tartalmaz,

b) a kevert oligonukleotidot vektorba építik oly módon, hogy funkcionálisan kapcsolódjon egy szabályozószakaszhoz, és a kívánt fehérjét kódoló struktúrgénhez,

c) a kapott vektorpopulációval gazdasejteket transzformálnak,

d) a transzformánsokból egy vagy több olyan klónt szelektálnak, amelyek a fúziós fehérjét nagy kitermeléssel kifejezik, és

e) a fúziós fehérjét kifejezik.

A találmány fúziós fehérjék előállítására vonatkozik.

Azokat a fehérjéket, amelyek a kívánt fehérje mellett egy nem kívánt alkotóelemet, úgynevezett ballaszt-részt tartalmaznak a végtermékben, fúziós fehérjéknek nevezik. Fehérjék géntechnológiai előállítása során a fúziós fehérjék köztermék állapotát elsősorban akkor alkalmazzák, ha a közvetlen kifejeződés során a kívánt fehérje viszonylag gyorsan lebomlik a gazda endogén proteázainak hatására, miáltal a kívánt fehérje kitermelése kisebb vagy nagyobb mértékben lecsökken.

Fúziós fehérjék előállítását ismerteti például Reidhaar-Olson és munkatársai: Science 241, 53–57 (1988), Bachmair és munkatársai: Science 234, 179–186 (1986), valamint a 4 769 326 számú USA-beli szabadalmi leírás.

A fúziós fehérje ballaszt részének kiterjedését általában úgy választják meg, hogy oldhatatlan fúziós fehérjét eredményezzen. Az oldhatatlanság egyrészt megfelelő védelmet nyújt a gazda endogén proteázaival szemben, másrészt lehetővé teszi a fúziós fehérjének az oldható sejt komponensektől történő könnyű elválasztását. Általánosan elfogadott megoldás, hogy a kívánt fehérje aránya a fúziós fehérjén belül viszonylag kicsi, vagyis a sejt viszonylag nagy mennyiségű ballasztanyagot termel.

Szükség van olyan fúziós fehérjék előállítására, amelyek rövid ballaszt részt tartalmaznak. Előállítottak például olyan génfúziót, amely a β -galaktozidáz és a szomatosztatin első tíz aminosavát tartalmazó fúziós fehérjét kódolja. Azt tapasztalták azonban, hogy ez a rövid aminosavlánc nem védi meg kellő módon a fúziós fehérjét a gazda endogén proteázainak lebontó hatásával szemben (4 366 246 számú USA-beli szabadalmi leírás, 15. oszlop, 2. bekezdés).

A 290 005 és 292 763 számú európai közrebocsátási irat olyan fúziós fehérjét ismertet, amelynek ballaszt része 250 aminosavnál hosszabb β -galaktozidáz-fragmentet tartalmaz. Ezek a fúziós fehérjék oldhatatlanok, de karbamiddal könnyen oldhatóvá alakíthatók (290 005 számú európai közrebocsátási irat).

Annak ellenére, hogy különböző fúziós fehérjék már ismertek, a megfelelő tulajdonságokkal, például proteáz rezisztenciával rendelkező fúziós fehérjék előállítása mindig munkáigényes folyamat, és a kapott fúziós fehérje gyakran számos nemkívánatos jellemzővel rendelkezik. Szükség van tehát olyan eljárás kidolgozására, amely lehetővé teszi előnyös tulajdonságokkal, így proteáz rezisztenciával rendelkező fúziós fehérjék előállítását, megfelelő hajtogatását, és a ballasztanyagot a kívánt fehérjétől történő hatékony lehasítását.

A találmány tárgya új eljárás valamely kívánt fehérjéből és egy ballaszt részből álló fúziós fehérjék előállítására oly módon, hogy

a) az adott ballaszt részt kódoló kevert oligonukleotidot állítunk elő, ahol az oligonukleotid DNS-szekvenciája (kódolószál)

(DCD)_x

részt tartalmaz, ahol

D jelentése A, G vagy T és

x értéke 4–12,

b) a kevert oligonukleotidot vektorba építjük oly módon, hogy funkcionálisan kapcsolódjon egy szabályozószakaszhoz és a kívánt fehérjét kódoló struktúrgénhez,

5 c) a kapott vektorpopulációval gazdasejteket transzformálunk,

d) a transzformánsokból egy vagy több olyan klónt szelektálunk, amelyek a fúziós fehérjét nagy kitermeléssel kifejezik, és

10 e) a fúziós fehérjét kifejezzük.

A találmány szerinti eljárás során tehát egy oligonukleotid könyvtárat (keveréket) állítunk elő, amely a ballaszt részt kódolja, a kevert oligonukleotidot (könyvtárat) egy vektorba építjük be úgy, hogy az oligonukleotid funkcionálisan kapcsolódjon egy szabályozószakaszhoz és a kívánt fehérjét kódoló struktúrgénhez, majd a kapott vektorpopulációval gazdasejteket transzformálunk. Ezután szelektáljuk a fúziós fehérjét nagy kitermeléssel kifejező transzformánsokat.

20 A találmány szerinti eljárás során előnyösen olyan oligonukleotidokat alkalmazunk, amelyek olyan aminosavat vagy aminosavak olyan csoportját kódolják, ami lehetővé teszi a kívánt fehérjének a ballaszt résztől történő könnyű lehasítását. A lehasítás megvalósítható

25 enzimatikusan vagy kémiaiilag.

A találmány szerinti eljárás során továbbá előnyösen olyan oligonukleotidokat alkalmazunk, amelyek könnyen oldhatóvá alakítható oldhatatlan fúziós fehérjékhez vezetnek. A találmány szerint előállított fúziós

30 fehérjék ezáltal kielégítik a proteáz rezisztencia követelményét.

Emellett a találmány szerint alkalmazott oligonukleotidok kialakíthatók úgy, hogy a ballaszt rész ne befolyásolja a kívánt fehérje hajtogatását.

35 Az 1. ábra, valamint az ennek folytatását jelentő 1a. és 1b. ábra pINT4x plazmidpopuláció (génbank) előállítását ismerteti az ismert pH154/25* plazmidból kiindulva a pINT40 plazmid segítségével. A további szerkezeteket grafikusán nem ábrázoltuk, mivel ezek az ábra alapján könnyen meghatározhatók.

A 2. ábra a teljes HMG CoA reduktáz gént tartalmazó pUH10 plazmid hasítási térképe.

A 3. és 3a. ábra a mini proinzulingént tartalmazó pIK4 plazmid előállítását mutatja.

45 A fúziós fehérjék előállítására szolgáló találmány szerinti eljárás jellemző vonása, hogy olyan kevert oligonukleotidot állítunk elő, amely a fúziós fehérje ballaszt részét kódolja. A kevert oligonukleotidot egy vektorba építjük be oly módon, hogy funkcionálisan kapcsolódjon egy szabályozószakaszhoz és kívánt fehérje struktúrgénjéhez. Megfelelő gazdasejteket transzformálunk a kapott plazmidpopulációval, és szelektáljuk a kódolt fúziós fehérjét nagy kitermeléssel előállító klónokat. A találmány szerinti eljárás előnyös megvalósítási módját az alábbiakban mutatjuk be:

55 Az oligonukleotid 3'-végén előnyösen olyan aminosavat vagy aminosavak olyan csoportját kódolja, amely lehetővé teszi a ballaszt résznek a kívánt fehérjétől történő könnyű, előnyösen enzimátikus lehasítását. Egy másik megvalósítási mód szerint olyan oligonukleotidot

állítunk elő, amely olyan oldhatatlan fúziós fehérjét eredményez, amely könnyen oldhatóvá tehető. Közlebről, előnyösen olyan oligonukleotidot állítunk elő, amely olyan ballasztrészt kódol, amely nem befolyásolja a kívánt fehérje hajtogatását.

Gyakorlati okokból a találmány szerint előállított oligonukleotid nagyon rövid ballasztrészt kódol.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a fúziós fehérjék különlegesen rövid ballasztrész esetén is kielégítik a proteázrezisztencia követelményét, és emellett nagy kitermeléssel előállíthatók, kívánt esetben oldhatatlanok, és könnyen oldhatóvá tehető. Oldott vagy oldható állapotban a találmány szerint előállított rövid ballasztrész lehetővé teszi a kívánt fehérje szterikusan kedvező konformációjának kialakulását, és így a kívánt fehérje könnyen hajtogatható, és a ballasztrésztől könnyen elválasztható.

Ha a kívánt fehérjét pro formában állítjuk elő, a ballasztrész kialakítható oly módon, hogy annak lehasítása a proproteinnek az érett fehérjévé történő átalakítása során önmagától bekövetkezzen. Például az inzulin előállítása során a ballasztrész és a C lánc egyidejűleg eltávolítható, amelynek során az inzulin érett származéka keletkezik, amely további veszteséget okozó mellékreakciók nélkül inzulinná alakítható.

A találmány szerint előállított rövid ballasztrész gyakorlatilag rövidebb, mint a fehérjék szokásos szignálszekvenciája, és nem befolyásolja a kívánt fehérje hajtogatását. Ennek következtében nincs szükség arra, hogy a ballasztrészt az érett fehérjét eredményező utolsó előállítási lépés előtt eltávolítsuk.

A ballasztrészt kódoló oligonukleotid előnyös DNS-szekvenciája (kódolószál) az alábbi képlettel ábrázolható:



ahol

D jelentése A, G vagy T

x értéke 4–12, előnyösen 4–8.

Közlebről, az oligonukleotid DNS-szekvenciája (kódolószál) előnyösen



ahol

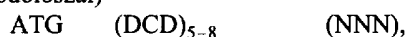
N jelentése az NNN triplettben a stop kodontól eltérő, azonos vagy különböző nukleotid,

z értéke 1–4,

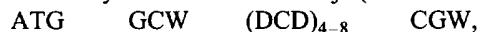
y+z értéke 6–12, előnyösen 6–10, ahol

y értéke legalább 4.

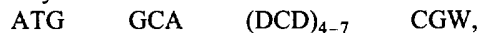
Tapasztalataink szerint előnyösen alkalmazható az az oligonukleotid, amelynek DNS-szekvenciája (kódolószál)



előnyösen amelynek DNS-szekvenciája (kódolószál)



vagy előnyösen

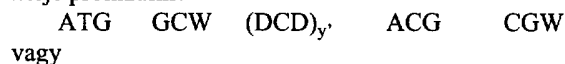


ahol

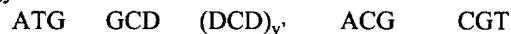
W jelentése A vagy T.

A fent említett DNS-modellszekvenciák kielégítik a kívánt követelményeket. A DCD kodon szerint, treonin és alanin aminosavakat kódol, és így viszonylag hidro-

fil proteinláncot eredményez. A stop kodonok ki vannak zárva, és az aminosavak választéka egy kezelhető körön belül marad. A ballasztrészt kódoló DNS-szekvencia előnyös megvalósítási módjai az alábbi képletekkel ábrázolhatók, különösen akkor, ha a kívánt fehérje proinzulin:



vagy



10 ahol

y' értéke 3–6, előnyösen 4–6.

A második kodon, a GCD alanint kódol, és teljessé teszi az NcoI restrikciós enzim felismerőszekvenciáját, feltéve, hogy az ezt megelőző szabályozószekvencia CC bázisokra végződik. Az utolsó előtti triplett treonint kódol, és az arginint kódoló CGT kodonnal együtt az MluI restrikciós enzim felismerőszekvenciáját eredményezi. Ennek következtében ez az oligonukleotid könnyen és problémamentesen beépíthető a génszerkezetekbe.

20

A (NNN)_z csoport a 3'-helyzetben olyan aminosavat vagy aminosavak olyan csoportját kódolja, amely lehetővé teszi a ballasztrésznek az ezt követő kívánt fehérjétől történő egyszerű, előnyösen enzimátikus lehasítását.

25

A nukleotidoknak ezt a csoportját előnyösen úgy választjuk meg, hogy a 3'-végen olyan restrikciós-enzimhasításihelyet kódoljon, amely lehetővé teszi a kívánt fehérje struktúrgénjének megkötését. Előnyös továbbá, ha az ATG start kodon, és kívánt esetben az első DCD triplett vonatkozásában olyan restrikciós-enzim-felismerőszekvenciát építünk be, amely lehetővé teszi a találmány szerinti ballasztrészt kódoló génnek a szokásos vektorokba történő könnyű beépítését.

30

A képletben szereplő z értékének felső határát egyrészt az előállított fúziós fehérje (enzimátikus) lehasítására szolgáló kívánt hasítási hely határozza meg, vagyis olyan kodonokat, például az Ile-Glu-Gly-Arg aminosavszekvenciát kódoló kodonokat jelent, amelyeknél a hasítás Xa faktossal megvalósítható. Az y+z összeg felső határa általában 12, mivel a ballasztrésznek a lehető legrövidebbnek kell lennie, és mindenképpen, nem szabad befolyásolnia a kívánt fehérje hajtogatását.

35

A géntechnológiai folyamatokban gazdaszervezetként előnyösen baktériumot vagy alacsonyabb rendű eukarióta sejtet, így élesztősejtet alkalmazunk, feltéve, ha nincs szükség magasabb rendű szervezetre. Ezekben a folyamatokban a heterológ gén kifejeződését homológ szabályozószakasz szabályozza, vagyis a szabályozószakasz hozzátartozik a gazdaszervezethez, vagy azzal kompatibilis. Prepeptid kifejezése közben gyakran előfordul, hogy a preszekvencia heterológ a gazdasejt vonatkozásában. A „szekvenciaharmonia” hiánya a gyakorlatban gyakran változó és megjósolhatatlan fehérje-kitermelést eredményez. Mivel a találmány szerinti ballasztrészt kódoló DNS-szekvenciát a környezethez adaptáljuk, a találmány szerinti szelekciós folyamatban harmonizált szekvenciájú DNS-szerkezet keletkezik.

40

A ballasztrész elejét és végét az alábbiakban határozzuk meg:

45

50

55

60

A ballasztrész elején metionin található, míg a végén olyan aminosav vagy aminosavak olyan csoportja van, amely lehetővé teszi a ballasztrésznek a kívánt fehérjétől történő elválasztását. Ha például a kívánt fehérje proinzulin, NNN triplettként arginint kódoló kodont alkalmazunk utolsó kodonként, mivel ez lehetővé teszi, hogy a ballasztrészt a C lánc eltávolításával egyidejűleg előnyösen lehasítsuk. Természetesen a ballasztrész vége lehet olyan aminosav vagy aminosavak olyan csoportja is, amely kémiai hasítást enged meg, ilyen például a metionin, amikor is a hasítás cian-bromiddal vagy -kloriddal valósítható meg.

A köztes aminosavszekvencia a lehető legrövidebb legyen, hogy ne befolyásolja a kívánt fehérje hajtogatását. Emellett szükséges, hogy ez a lánc viszonylag hidrofíll legyen, ami elősegíti a fel nem oldott fúziós fehérje szolubilizálását, és a fúziós fehérje oldható marad. A ciszteinmaradékok kevésbé előnyösek, mivel diszulfidhidak képzésére hajlamosak.

A ballasztrész kódoló DNS-t kevert oligonukleotid formájában állítjuk elő, ezt egy megfelelő kifejezőplazmidba építjük be közvetlenül a kívánt fehérje struktúrgénje elé, és az így kapott génbankkal *E. coli*-t transzformálunk. A megfelelő fúziós fehérjéket termelő bakteriális klónok ezt követő kiválogásával ily módon megfelelő génszerkezetek állíthatók elő.

Már említettük továbbá, hogy a ballasztrészt kódoló nukleotidszekvencia elején és végén található restrikcióenzim-felismerőhelyek csak példaként szolgálnak. Az ATG start kodont körülvevő felismerőszekvenciára, amelyben a további nukleotidok megfelelő aminosavakra vonatkozó kodonokat képeznek, példaként említhetők az AflIII, NdeI, NlaIII, NspHI vagy StyI restrikciós enzimek felismerőhelyei. Mivel az előnyös megvalósítási módban a ballasztszekvencia végén arginin ta-

Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Thr	
GCG	ACC	ACC	AGC	ACC	GCG	ACC	ACC	p. c. u.
GCA	ACA	ACA	TCA	ACA	GCA	ACT	ACG	találmány

A proinzulint tartalmazó fúziós fehérjék esetében a kezdeti startpont egy tíz aminosavat tartalmazó ballasztrész. A legjobb előállítást biztosító DNS-szekvencia szolgál a szekvencia változatainak alapjaként, miáltal megfigyelhetővé vált, hogy akár három aminosav is kiiktatható anélkül, hogy a relatív kifejeződési arány jelentős mértékben csökkenne. Ez a tapasztalat nemcsak meglepő, mivel nem volt előre várható, hogy az ilyen rövid ballasztféhrje alkalmazható, hanem nagyon előnyös is, mivel a proinzulin relatív aránya a fúziós fehérjén belül természetesen olyan mértékben nő, ahogy a ballasztrész csökken.

A ballasztrésznek a fehérjében betöltött szignifikanciája az alábbi összehasonlításból látható:

A humán proinzulin 86 aminosavat tartalmaz. Ha a 290 005 számú európai közrebocsátási irat szerinti fúziós fehérjéhez a ballasztrész alsó határáként 250 aminosavat alkalmazunk, a fúziós fehérje 336 aminosavat tartalmaz, amelynek csak mintegy negyede jelenik meg a

lálható, és hat különböző kodon kódolja az arginint, az MluI enzim helyett további megfelelő restrikciós enzimek is találhatóak, például az NruI, AvrII, AflIII, ClaI vagy HaeII.

5 Előnyös továbbá a Saiki R. K. és munkatársai [Science, 239, 487–491 (1988)] szerinti „Polimeráz láncreakció” (PCR) alkalmazása is, ami a restrikciós enzimek speciális felismerőhelyeinek kialakítása nélkül is használható.

10 Mint fent említettük, a (CDC)_x DNS-szekvencia alkalmazása nem korlátozó jellegű, és nem zárja ki más kodonok, például a glicint, prolint, lizint, metionint vagy aszparagint kódoló kodonok alkalmazását.

15 A legelőnyösebb DNS-szekvenciák a fúziós fehérje, például a proinzulint tartalmazó fúziós fehérje előállítására vonatkozásában előnyös szekvenciák kiválogatásával nyerhetők. Ezek eredményezik a szabályozószekvencia, a ballasztszekvencia és a kívánt fehérje legkedvezőbb kombinációját, miáltal elkerülhetők a promoter, ballasztszekvencia és struktúrgén kedvezőtlen kombinációi, és az említett „szekvenciaharmónia” kialakításához szükséges minimális ráfordítás mellett is jó eredményeket biztosítanak.

25 Meglepő módon azt találtuk, hogy a találmány szerinti ballasztrészt kódoló optimalizált gének nem mindig tartalmazzák az *E. coli* által előnyben részesített tripletteket. Azt találtuk, hogy a Thr esetében az ACA kodon, amely az *E. coli*-ban a legkevésbé fordul elő, gyakran jelen van a kiválasztott szekvenciákban. Ha például az alábbi aminosavszekvenciát optimalizálnánk az *E. coli* szerinti előnyös kodonhasználat (preferred codon usage, p. c. u.) szerint [p. c. u.: Aota S. és munkatársai: Nucleic Acids Research 16 (kiegészítés) r315, r316, r391, r402 (1988)] a találmány szerintitől teljesen eltérő génszerkezetet kapnánk (1. táblázat):

45 kívánt fehérjében. Ezzel összehasonlítva, a ballasztrészben csak hét aminosavat tartalmazó, találmány szerinti fúziós fehérje 93 aminosavból áll, amelyen belül a proinzulin aránya 92,5%. Ha a kívánt fehérje a proinzulinnál sokkal több aminosavat tartalmaz, a ballaszt és a kívánt fehérje közötti arány még kedvezőbbé válik.

50 Hangsúlyozzuk, hogy a proinzulin a találmány szerinti kívánt fehérje egyik előnyös példája csupán. A találmány szerinti megoldás sokkal kiterjedtebb fúziós fehérjéknél is alkalmazható, amelyre példaként a humán 3-hidroxi-3-metil-glutaril-koenzim A redukáz (HMG) aktív doménjét tartalmazó fúziós fehérje említhető. Ez a fehérje 461 aminosavat tartalmaz, az ezt kódoló gént a 292 803 számú európai közrebocsátási irat ismerteti.

60 A találmány szerinti megoldást a fenti általános ismertetés után közelebbről az alábbi példákkal mutatjuk be anélkül, hogy az oltalmi kör a példákra korlátozódna.

1. példa

Génbank előállítás és magas kifejezőképességű klónok kiválogatása

Ellenkező értelmű megjelölés hiányában a tápközegeket Maniatis T., Fritsch E. F. és Sambrook J.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) szerint állítjuk elő. A

TP közeg M9CA közeget tartalmaz egyenként 0,4 tömeg%

glükózzal és kazaminosavval kiegészítve. Ellenkező értelmű megjelölés hiányában a közegek 50 µg/ml ampicillint tartalmaznak. A fermentálás során a baktérium növekedését a tenyészközeg 600 nm-en mért optikai sűrűsége (OD) mérésével határozzuk meg.

Kiindulási anyagként a 211 299 számú európai közrebocsátási iratból ismert pH154/25* plazmidot (1. ábra) alkalmazzuk. Ez a plazmid egy fúziósfehérje-gént (D'-proint) tartalmaz, amely egy trp-promoterhez és egy ampicillin- (Amp) rezisztenciát kódoló génhez kapcsolódik. A fúziósfehérje-gén olyan fúziós fehérjét kódol, amely az *E. coli*-ből származó trpD-fehérje egy fragmensét (D'), és majomproinzulint (Proin) tartalmaz. A plazmid génszerkezete egy policisztronos mRNS-t eredményez, amely mind a fúziós fehérjét, mind a rezisztencia génterméket kódolja. A felesleges rezisztencia géntermék képződésének elnyomása érdekében a trp transzkripciósterminátor-szekvenciát (trpTer) [Pharmacia, katalógusszám: 27-4884, trp A transzkripciósterminátor néven, az 1. ábrán [(2) terminátor] építjük be a két struktúrgén közé. Ehhez a plazmidot EcoRI enzimmal felnyitjuk, és a túlnyúló végeket Klenow-polimerázzal feltöltjük. A kapott tompa végű DNS-fragmenst a (2) terminátorszekvenciához kapcsoljuk, amelynek során pINT12 plazmidot [1. ábra, (3) plazmid] kapjuk.

```
5' AGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTT3'
3' TCGGGCGGATTACTCGCCCGAAAAAAA5' (2)
```

A kiindulási pH154/25* plazmid egy PvuI hasítási helyet tartalmaz az Amp génben, valamint egy HindIII hasítási helyet tartalmaz a trpD-fragmens karboxi-terminális szakaszában. Minkét hasítási hely megjelenik ezért a pINT12 plazmidban. A (3) plazmid PvuI és HindIII enzimekkel végzett hasításával két fragmenst kapunk, amelyek közül izoláljuk a proinzulingént tartalmazó fragmenst [1. ábra, (4) fragmens]. A pGATTP plazmidot [4 832 959 számú USA-beli szabadalmi leírás, 1a. ábra, (5) plazmid], amelyet a (3) plazmiddal analóg módon állítunk elő, és amely a D'-proin gén helyett NcoI és HindIII hasítási helyeket tartalmazó gamma-interferongént (Ifn) hordoz, PvuI és HindIII enzimekkel hasítjuk, és a promoter régiót tartalmazó fragmenst [1a. ábra, (6) fragmens] izoláljuk. Ezt a (6) fragmenst a (3) plazmidból származó (4) fragmensevel ligálva pINT40 plazmidot [1a. ábra, (7) plazmid] ka-

punk. A maradék gamma-interferongént tartalmazó kis fragmenst ez utóbbiról Nco és MluI enzimmal lehasítjuk. A nagyméretű fragmenst [1b. ábra, (8) fragmens] (9) kevert oligonukleotiddal ligáljuk,

```
5' CATGGCDDCDDCDDCDDCDDCDDCA3'
3' CGHHGHHGHHGHHGHHGHHGHHGHTGCGC5' (9)
```

ahol

D jelentése A, G vagy T és

H jelentése ezekkel komplementer nukleotid.

Ez a pINT4x plazmidpopulációt (génbank) [1b-(10). ábra] eredményezi. A találmány szerinti oligonukleotidkeverék szakember számára ismert technológiákkal előállítható.

A (9) kevert oligonukleotidot (9a) szintetikus kevert oligonukleotidból állítjuk elő,

```
TTCGGGTAAACCGHHGHHGHHGHHGHHGHHGHTGCGCAG5'
TTGCCCATGGC3' (9a)
```

amelyet Klenow-polimerázzal feltöltünk, és MluI és Nco enzimmal hasítunk.

Az *E. coli* WS3110 törzset a (10) plazmidpopulációval transzformáljuk, és a baktériumokat LB agarlemezre szélesztjük. A kapott baktériumklónok közül hatot vizsgálunk az inzulint tartalmazó fúziós fehérje termelésének képességére. Ebből a célból a klónokat LB közegen egy éjszakán keresztül tenyésztjük, 100 µl alikvot részt 10,5 ml TP közeggel keverünk, és 37 °C hőmérsékleten rázzuk. Az OD₆₀₀=1 értéknél a tenyészeteket 200 µg/ml 3-β-indolil-akrilsavval (IAA) elegyítjük, majd 40 mg glükóz 100 ml vízben felvett oldatát adjuk hozzá, és a készítményt további 3 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten rázzuk. Ezt követően 6OD ekvivalens tenyészetet eltávolítunk, a bennük lévő baktériumokat centrifugálással elválasztjuk, és 300 µl tesztpufferben [37,5 mmol/l Trisz (pH=8,5), 7 mol/l karbamid, 1 vegyes% SDS és 4 térfogat% 2-merkapto-etanol] szuszpendáljuk. A szuszpenziót 5 percen keresztül melegítjük, 2 másodpercen keresztül ultrahanggal kezelve lecsökkentjük a viszkozitást, és alikvot részét ezután SDS-gél elektroforézisre visszük. A fúziós fehérjét termelő baktériumoknál egy fehérjesávra számíthatunk a 10 350 D móltömegértéknél. Magától értetődő, hogy egy klón, a pINT41 plazmid (1. táblázat) a megfelelő fehérjét viszonylag nagy mennyiségben termeli, míg a többi klónnál fehérjetermelés nem mutatható ki. Inzulinspecifikus antitestekkel végzett immunfoltvizsgálattal ellenőrizhető, hogy a pINT41 plazmid által kódolt fehérje inzulint tartalmaz.

Az 1. táblázat különböző plazmidszerkezetek ballasztrészének DNS- és aminosavszekvenciáját tartalmazza. Közlelebről, az 1. táblázat a pINT41 fúziós fehérjében található ballasztrész DNS- és aminosavszekvenciáját tartalmazza.

1. táblázat

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	pINT	
Met	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Thr	---	Arg		
ATG	GCA	ACA	ACA	TCA	ACA	GCA	ACT	ACG	---	CGT	41	
				Thr	Ser	Thr			---			
***	***	***	**G	A*T	T*G	A*G	**G	***	---	***	42	
		Ala		Thr	Ser	Thr	Ser		---			
***	**T	G**	***	A*T	T*T	A*T	T*A	***	---	***	43	
						---	Asn	Ser	---			
***	***	***	***	***	---	AAC	T*A	***	---	***	60	
									---	---		
***	***	***	***	***	***	***	***	***	---	---	**A	67d
									---	---		
***	***	***	***	***	***	***	---	---	---	---	**A	68d
									---	---		
***	***	***	***	***	***	---	---	---	---	---	**A	69d, 72d
							Gly	Asn	Ser	Ala		
***	***	***	***	***	***	**G*	*A*	T**	GCA	**A	90d, 91d	
							Lys	---	---	---		
***	***	***	***	***	***	AA*	---	---	---	**A	93d	
							Pro	---	---	---		
***	***	***	***	***	***	C**	---	---	---	**A	94d	
							Met	---	---	---		
***	***	***	***	***	***	ATG	---	---	---	**A	95d	
							Gly	---	---	---		
***	***	***	***	***	***	*G*	---	---	---	**A	96d	

2. példa

További klónok szelektálása

A többi alkalmazható klónt Helfman D. M. és munkatársai módszerével [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 31–35 (1983)] mutatjuk ki. TP agar lemezeket alkalmazunk ehhez, amelyek 40 µm/ml IAA-t tartalmaznak. Alkalmazás előtt 15 perccel az agarlemezek felületét 2 mm vastag TP felső agarréteggel vonjuk be, erre mitro-cellulóz-szűrőt helyezünk, és a frissen transzformált sejteket a szűrőre visszük. Másolatokat készítünk arról a szűrőről, amelyen 37 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után a baktériumtelepek növekednek, majd az eredeti szűrőről származó baktériumokat roncsoljuk. Ehhez a szűrőt egy deszikkátorban 15 percen keresztül kloroformatmoszférának tesszük ki, majd lassan mozgatjuk 6 órán keresztül szobahőmérsékleten immunpufferben [50 mmol/l Trisz (pH=7,5), 150 mmol/l nátrium-klorid, 5 mmol/l magnézium-klorid és 3 vegyes% BSA], amely 1 µg/ml D-náz I-et és 40 µg/ml lizozimot tartalmaz, majd kétszer 5 percen keresztül mosópufferben [50 mmol/l Trisz (pH=7,5) és 150 mmol/l nátrium-klorid] mossuk. A szűrőket ezután egy éjszakán keresztül 3 °C hőmérsékleten inzulinspecifikus antitesteket

tartalmazó immunpufferben inkubáljuk, négyszer 5 percen keresztül mosópufferben mossuk, 1 órán keresztül protein A torna-peroxidáz-konjugátumot tartalmazó immunpufferben inkubáljuk, négyszer 5 percen keresztül mosópufferben mossuk, és az antitesteket megkötő telepeket színreakcióval láthatóvá tesszük. A megfelelően nagy mennyiségű fúziós fehérjét termelő pINT42 és pINT43 klónok 500 telepben mutathatók ki. A szekvenálással megállapított DNS-szekvencia és az ebből leszármaztatott aminosavszekvencia megfelel az 1. táblázatban megadottaknak.

3. példa

pINT41d plazmid előállítás

A pINT41 plazmid a replikációs origó és a trp promoter között egy nemesszenciális DNS-szakaszt tartalmaz, amelyhez Nsp(7524)1 enzim hasítási hely csatlakozik. A fenti szakasz eltávolításához a pINT41 plazmidot Nsp(7524)1 enzimmel hasítjuk, a nagyméretű fragmenst izoláljuk, és ismét ligáljuk. Így pINT41d plazmidot kapunk, amelynek DNS-szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

10	30	50
GTGTCATGGT	CGGTGATCGCCAGGGT	GCCGACGCGCATCTCGACTTGCACGGTGCACCAA
70	90	110
TGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTTCGTAATCAC		
130	150	170
TGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTGGCGCCGACA		
190	210	230
TCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGT		
250	270	290
TAACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCGACCATGGCAACAACATCAACAGCAA		
310	330	350
CTACGCGTTTTCGTGAACCAGCACCTGTGCGGCTCCACCTAGTGGAAGCTCTCTACCTGG		
370	390	410
TGTGCGGGGAGCGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCGGGAGGCAGAGGACCCCTC		
430	450	470
AGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGCCCTGGCGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGGCGC		
490	510	530
TGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGCGGCATCGTGGAGCAGTGCTGCACCAGCATCTGCTCCC		
550	570	590
TCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAATAGTCGACCTTTGCTTTCATTGTCGATGATA		
610	630	650
AGCTGTCAAACATGAGAAATTAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTAATTCTTGAAGA		
670	690	710
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCT		
730	750	770
TAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTC		
790	810	830
TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAA		
850	870	890
TATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTT		

2. táblázat (folytatás)

910	930	950
GCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT		
970	990	1010
GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC		
1030	1050	1070
CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA		
1090	1110	1130
TGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCCGCATAAC		
1150	1170	1190
TATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC		
1210	1230	1250
ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCCGCCAAC		
1270	1290	1310
TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG		
1330	1350	1370
GATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC		
1390	1410	1430
GAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGC		
1450	1470	1490
GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT		
1510	1530	1350
GCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA		
1570	1590	1610
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC		
1630	1650	1670
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG		
1690	1710	1730
ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCA		
1750	1770	1790
TATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC		
1810	1830	1850
CTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA		
1870	1890	1910
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC		
1930	1950	1970
TGCTTGCAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTA		
1990	2010	2030
CCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT		
2050	2070	2090
CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCCTACATACCTC		
2110	2130	2150
GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG		
2170	2190	2210
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGTAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGT		
2230	2250	2270
GCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC		
2290	2310	2330
ATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCA		
2350	2370	2390
GGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATA		
2410	2430	2450
GTCCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG		
2470	2490	2510
GGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCT		
2530	2550	2570
GGCCTTTTGCTCACATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGGAGGCAGC		

TG

4. példa

pINT41d fúziós fehérje fermentálása és előállítása

i) Fermentálás:

LB közegben rázótenyészetet állítunk elő pINT41d plazmival transzformált *E. coli* W3110 törzsből. 15 µl tenyészetet OD=2 értéknél 15,7 l TP közegbe töltünk, és a szuszpenziót 16 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten fermentáljuk. A tenyészetet OD=13 értéknél 20 µg/ml IAA-val elegyítjük, majd további 5 órán keresztül fermentáljuk, amelynek során 100 ml/óra áramlási sebességgel 50 vegyes%-os maltózoldatot szivattyúzunk az elegybe. Az OD=17,5 érték elérésekor a folyamatot leállítjuk. Végül a baktériumokat centrifugálással betakarítjuk.

ii) A sejtek roncsolása:

A sejteket 400 ml dezintegrálópufferben [10 mmol/l Trisz (pH=8,0), 5 mmol/l EDTA] szuszpendáljuk, és franciaprésben roncsoljuk. Az inzulint tartalmazó fúziós fehérjét ezután 30 percen keresztül 23 500 g értéken centrifugálva bekoncentráljuk, és dezintegrálópufferrel mossuk. Így 134 g (nedves tömeg) üledéket kapunk.

iii) Szulfitolízis:

12,5 g (nedves tömeg) üledéket ii) 125 ml 8 mol/l koncentrációjú karbamidoldatba keverünk 35 °C hőmérsékleten. Az elegyet 30 percen keresztül kevertetjük, majd nátrium-hidroxid-oldattal pH=9,5 értékre állítjuk, és 1 g nátrium-szulfittal reagáltatjuk. Az elegyet további 30 percen keresztül 35 °C hőmérsékleten kevertetjük, 0,25 g nátrium-tetracionátot adunk hozzá, és 30 percen keresztül 35 °C hőmérsékleten tovább kevertetjük.

iv) DEAE anioncserélő kromatográfia:

A iii) pont során kapott terméket 250 ml A pufferben [50 mmol/l glicin (pH=9,0)] felvesszük, és fraktogél TSK DEAE-650 töltettel töltött kromatográfias oszlopra (oszloptérfogat 130 ml, átmérő 26 mm) visszük, amelyet A pufferrel kiegyensúlyoztunk. A pufferrel történő mosás után a fúziós fehérje S-szulfonátot egyenként 250 ml A puffert és B puffert [50 mmol/l glicin (pH=9,0), 3 mol/l karbamid és 1 mol/l nátrium-klorid] tartalmazó sóradienssel eluáljuk 3 ml/perc sebességgel. A fúziós fehérje S-szulfonátot tartalmazó frakciókat egyesítjük.

v) Hajtogatás és enzimátikus hasítás:

Az iv) pont egyesített frakcióit 4 °C hőmérsékleten 1:9 térfogatarányban hajtogatópufferrel [50 mmol/l glicin (pH=10,7)] hígítjuk, és a kapott oldatot literenként 410 mg aszkorbinsavval és 165 µl 2-merkaptó-eta-

nollal elegyítjük 4 °C hőmérsékleten óvatos kevertetés közben. Az elegyet ezután pH=10,5 értékre állítjuk, 4 °C hőmérsékleten további 4 órán keresztül kevertetjük, majd 24 g/l végkoncentrációig szilárd N-(2-hidroxi-etil)-piperazin-N'-2-etán-szulfonsavat (HEPES) adunk hozzá. A kapott elegyet (pH=8) 25 °C hőmérsékleten tripszinnel emésztjük. Az emésztési folyamat során az enzimkoncentrációt 80 µg/l értéken tartjuk. Az emésztés lejátszódását RP-HPLC-kromatográfiásan ellenőrizzük. Két óra elteltével a reakciót 130 µg szójabab-tripszin inhibitor hozzáadásával megállítjuk. HPLC-analízissel a iii) pont szerinti elegyből 19,8 mg di-Arg inzulin mutatható ki. A hasított termék azonosítását fehérjeszekvenálással és összehasonlító anyaggal végzett HPLC-analízissel ellenőrizzük. A di-Arg inzulin ismert módon kromatográfiásan tisztítható, és karboxi-peptidáz B segítségével inzulinná alakítható.

5. példa

pINT60 plazmid előállítása

A pINT60 plazmid egy inzulinkekurzorból és csupán kilenc aminosavat tartalmazó ballasztrészből épül fel. A plazmid előállításához a pINT40 plazmidot Nco és MluI enzimmel hasítjuk, és a kapott vektorfragmenst izoláljuk. Ezután Inzul5 oligonukleotidot szintetizálunk, amelynek szekvenciája:

TTCCGGGTACCGTTGTTGTAGTTTGTAGTTGCGCAG 5'

TTGCCCATGGC 3'

Klenow-polimerázzal feltöltjük, és a fenti két enzimmel hasítjuk. A kapott DNS-fragmenst ezután a vektorfragmenssel ligálva pINT60 plazmidot kapunk.

Az 1. táblázat tartalmazza a fenti fúziós fehérjében található ballasztrész DNS- és aminosavszekvenciáját.

6. példa

pINT67d plazmid előállítása

A pINT67d plazmid a pINT41d plazmid származéka, amelyben a ballasztrész 9. pozíciójú aminosavának kodonját kiiktattuk. Ennek eredményeként a kapott plazmid a pINT60 plazmidhoz hasonlóan egy inzulinkekurzort és kilenc aminosavból álló ballasztrészt eredményez. Az előállításához Ho S. N. és munkatársai módszerét [Gene, 77, 51-59 (1989)] alkalmazzuk. Ehhez két külön PCR-t képzünk a pINT41d plazmival és a két oligonukleotidpárral:

TIR: 5'-CTG AAA TGA GCT GTT GAC-3'

és

DTR8: 5'-CAC AAA TCG AGT TGC TGT TGA TGT TGT-3'

vagy

DTR9: 5'-ACA GCA ACT CGA TTT GTG AAC CAG CAC-3'

és

Inzul1: 5'-TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT-3'.

Így két fragmenst kapunk, amelyek részlegesen komplementerek egymáshoz, és egymáshoz kapcsolva a pINT41d plazmidéhoz hasonló inzulinprekuzort kódolnak, amelyben azonban hiányzik a 9. helyzetű aminosav. A két fragmenst egyesítjük, a TIR és Insu11 oligonukleotidokkal egy másik PCR-t képzünk. Az így kapott DNS-fragmensből az inzulinprekuzor struktúrgénjét Nco és Sall enzimmel végzett hasítással felszabadítjuk, és tisztítjuk. A pINT41d plazmidot ezután a fenti két enzimmel is hasítjuk, a vektorfragmenst tisztítjuk, és a PCR-ből származó struktúrgénfragmenssel ligálva pINT67d plazmidot kapunk.

A ballasztrész nukleotid- és aminosavszekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza.

TIR: 5'-CTG AAA TGA GCT GTT GAC-3'
és
DTR10: 5'-CAC AAA TCG TGC TGT TGA TGT TGT TGC-3'
vagy
DTR11: 5'-TCA ACA GCA CGA TTT GTG AAC CAG CAC-3'
és
Insu11: 5'-TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT-3'

A ballasztrész nukleotid- és aminosavszekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza.

8. példa

pINT69d plazmid előállítás

A pINT69d plazmid szintén a pINT41d plazmid rövidített származéka, amelyben a ballasztrész 7., 8. és

TIR: 5'-CTG AAA TGA GCT GTT GAC-3'
és
DTR12: 5'-CAC AAA TCG TGT TGA TGT TGT TGC CAT-3'
vagy
DTR13: 5'-ACA TCA ACA CGA TTT GTG AAC CAG CAC-3'
és
Insu11: 5'-TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT-3'

A ballasztrész nukleotid- és aminosavszekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza.

9. példa

pINT72d plazmid előállítás

A pINT72d plazmid a pINT69d plazmid származéka, amelyben az első arginin aminosavkodója kivételével

TIR: 5'-CTG AAA TGA GCT GTT GAC-3'
és
Insu28: 5'-GAT GCC GCG GGT CTT GGG TGT-3'
vagy

7. példa

pINT68d plazmid előállítás

A pINT67d plazmidhoz hasonlóan a pINT68d plazmid is a pINT41d plazmid rövidített származéka, amelyben hiányzik a ballasztrész 8. és 9. aminosavainak kodonja. Így olyan inzulinprekuzort kapunk, amelyhez csupán nyolc aminosavból álló ballasztrész kapcsolódik. Az előállítás során a 6. példában leírt eljárást alkalmazzuk, amelynek során az alábbi két oligonukleotidpárt használjuk:

9. pozíciójú három aminosavának kodonja hiányzik. Így olyan inzulinprekuzort kapunk, amelyhez csupán hét aminosavból álló ballasztrész kapcsolódik.
30 Az eljárás során a 6. példában leírt eljárást alkalmazzuk, amelyhez az alábbi két oligonukleotidpárt használjuk:

vel a teljes C peptid gén szakasz hiányzik. Ennek megfelelően olyan miniproinzulin-származékot kapunk, amely a C lánc helyett egy argininmaradékot tartalmaz.
50 A pINT69d plazmidból kiindulva a 6. példában leírt eljárást alkalmazzuk, amelynek során az alábbi két oligonukleotidpárt használjuk:

Insu27: 5'-AAG ACC CGC GGC ATC GTG GAG-3'

és

Insu11: 5'-TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT-3'.

10. példa

pINT73d, INT88d és pINT89d plazmidok előállítása

A pINT73d plazmid a pINT69d plazmid (8. példa) származéka, amelyben egymás után kétszer megtalálható az inzulinprekursor-gén. A plazmid ezért olyan policisztronos mRNS-t eredményez, amely megkésze-rezi a kitermelést. Előállításához egy PCR-reakciót vé-geztünk a pINT69d plazmiddal és a következő két oligonukleotiddal:

Insu29: 5'-CTA GTA CTC GAG TTC AC-3'

és

Insu11: 5'-TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT-3'.

Így olyan fragmenst kapunk, amely az inzulinprekursor-gént az ennek megfelelő riboszóma kötőhe-lyet tartalmazza, amelynek 5'-végén XhoI hasítási hely és 3'-végén Sall hasítási hely található. A fragmenst a fenti két enzimmel hasítjuk, és tisztítjuk. A pINT69d plazmidot ezután Sall enzimmel linearizáljuk, és a ka-pott két DNS-véget foszfátazzal (borjúbélfoszfátáz) defoszforilezzük, és a PCR-reakcióval kapott fragmens-sel ligálva pINT73d plazmiddá alakítjuk.

Analóg módon állíthatók elő a pINT88d és pINT89d plazmidok, ha a pINT72d plazmidot (9. pél-da) hasonlóképpen módosítjuk a mini proinzulingén kétszer vagy háromszor történő összekapcsolásával.

LPL3: 5' ATGAATTTCGATCTCTCACCTACCAAACAAT 3'

és

LPL4: 5' TTGCCATGGGGATTCTCCTGTGTCAGTTAGCT 3',

amelyek segítségével a promotorszakaszhoz EcoRI és Nco hasítási helyeket kapcsolunk. Egy PCR-t végzünk a fenti oligonukleotidokkal és a pPL-lambda plazmiddal, majd a kapott promoterfragmenst EcoRI és Nco enzim-mel hasítjuk és izoláljuk, a pINL41d plazmidot szintén a fenti két enzimmel hasítjuk, és a kapott promotermentes vektorfragmenst a lambda-pL promoterfragmense-sel ligálva pL41c plazmiddá alakítjuk.

13. példa

pL41d plazmid előállítása

A pL41c plazmidban a rezisztenciagén és a fúziós-fehérje-gén között elhelyezkedő trp-transzkripció-s terminátor nem hatékony a fermentációra alkalmas E. coli törzsekben (például E. coli N4830-1 törzsben). Emi-att egy policisztronos mRNS és általa nagy mennyiségű rezisztenciagén-termék képződik a fermentációban. A fenti mellékreakció kiküszöbölése érdekében a trp-ter-

11. példa

pINL41d plazmid előállítása

Kiindulási anyagként pRUD3 plazmidot haszná-lunk, amelynek szerkezete analóg a pGATTP plazmid szerkezetével. A trp-promoter szakasz helyett azonban egy tac-promoter szakaszt tartalmaz, amelyhez EcoRI és Nco hasítási helyek kapcsolódnak. A plazmidot EcoRI enzimmel hasítjuk, a hasítási hely túllógó végeit Klenow-polimerázzal feltöltjük, majd Nco enzimmel hasítunk, és a kapott promoterfragmenst izoláljuk.

A pINT41d plazmid trp-promoterét kiegészítjük a PvuII és Nco enzimek hasítási helyével. Mivel a plazmid egy további PvuII hasítási hellyel rendelkezik, teljesen hasítható Nco enzimmel és csak részlegesen hasítható PvuII enzimmel. Azt a vektorfragmenst, amelyből csak a promotorszakasz hiányzik, izoláljuk a kapott fragmensek közül, majd a tac-promoter frag-menssel ligálva pINL41d plazmiddá alakítjuk.

12. példa

pL41c plazmid előállítása

A pPL-lambda plazmid (Pharmacia) egy lambda-pL-promoter szakaszt tartalmaz. Ez utóbbit az alábbi nukleotidszekvenciákkal kapcsoljuk:

5' GATCTCTCACCTACCAAACAAT 3'

és

5' AGCTAACTGACAGGAGAATCC 3'.

LPL3 és LPL4 oligonukleotidokat állítunk elő.

minátorszekvenciát az E. coli-rrmB-operon hatékony ter-minátor szekvenciájával helyettesítjük. A pANGMA plazmid szerkezete hasonló a pINT41d plazmid szerkeze-téhez, de egy angiogenin gént tartalmaz a fúziósfehérje-gén helyett, és egy rrmB-terminátor [Borsius J. és munka-társai: Gene 27, 161-172 (1984)] szekvenciát tartalmaz (a kereskedelmi pKK223-3 plazmidból, Pharmacia) a trp-terminátor szekvencia helyett. A plazmidot PvuII és Sall enzimekkel emésztjük, és az rrmB-terminátort tartal-mazó fragmenst izoláljuk. A pL41c plazmidot ezután szintén a fenti két enzimmel hasítjuk, és az inzulingént tartalmazó fragmenst izoláljuk. A két izolált fragmenst ligálva pL41d plazmidot kapunk.

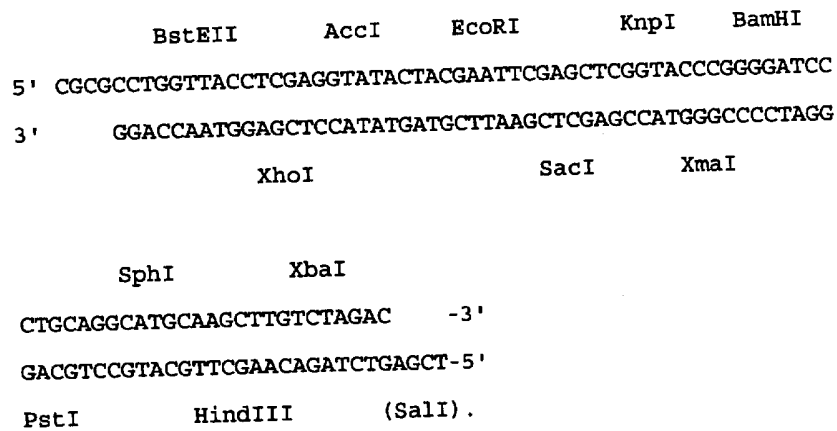
14. példa

pINTLI plazmid előállítása

A fúziós fehérjék kifejezéséhez általánosan alkal-mazható plazmid előállításához a pINT41d plazmid

proinzulingénjét egy polilinkerszekvenciával helyettesítjük. Ezt a gént MluI és Sall hasítási helyekkel farkazzuk. A plazmidot ehhez a fenti két enzimmel hasítjuk,

és a vektorfragmenst izoláljuk. Ezt azután az alábbi két szintetikus oligonukleotiddal ligálva pINTLI plazmiddá alakítjuk.

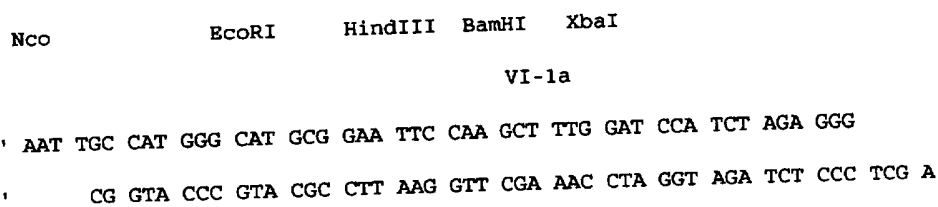


15. példa

HMG CoA reduktáz kódoló gén (aktív domén) beépítése a pINTLI plazmidba és a fúziós fehérje kifejezése

A 3. táblázat a HMG CoA reduktáz gén DNS- és aminosavszekvenciáját mutatja. A 292 803 számú európai közrebocsátási iratból ismert szintetikus HMG CoA reduktáz gén BstEII hasítási helyet tartalmaz a 3. és 4. helyzetű Leu és Val aminosavak régiójában (lásd a 3. táblázatot). A gén végén az XbaI enzimmel megfelelő túlnyúló szekvencia keletkezik (a nemkódoló szakaszban). A pINTLI plazmid polilinkerjében a megfelelő hasítási hely ugyanabban a leolvasási keretben ta-

20 lálható. A két hasítási hely mindkét esetben egyedülálló. A pUH10 plazmid tartalmazza a 3. táblázat szerinti DNS-szekvenciának megfelelő teljes HMG gént (HMG I, II, III és IV fragmensek). A pUH10 plazmid (2. ábra) előállítását a 292 803 számú európai közrebocsátási irat ismerteti. Röviden, speciális plazmidokat állítunk elő a HMG I–HMG IV génfragmensek szubklónozásához, és a teljes gén előállításához. Ezek a plazmidok a kereskedelmi forgalomban kapható pUC18, pUC19 és M13mp18 vagy M13mp19 vektorokból származnak, ahol a polilinkerszakaszt egy VI képletű DNS-szekvenciának megfelelő új szintetikus polilinker helyettesíti.



VI-1a

VI-1b

A fenti új plazmidok előnye, hogy a pUC és M13mp plazmidokkal ellentétben lehetővé teszik az Nco restriktív enzimmel megfelelő túlnyúló szekvenciákat tartalmazó DNS-fragmensek klónozását. Emellett az Nco, EcoRI, HindIII, BamHI és XbaI hasítási helyeknek megfelelő felismerőszekvenciák a vektorokban ugyanazokban a szekvenciákban található meg, mint a teljes HMG génben, ami elősegíti a szekvenciális klónozást, és a gén előállítását. Így lehetővé válik a HMG I–HMG IV génfragmenseknek az új plazmidokba történő szubklónozása. A génfragmensek alkalmazása után ezek kombinációjával kinyerhető a teljes gén (lásd később).

a) VI képletű DNS-szekvenciákat tartalmazó vektorok előállítása

Az V képletű DNS-szekvencia szokásos módon előállítható. A kereskedelmi forgalomban kapható pUC18 plazmidot (vagy pUC19, M13mp19 vagy M13mp18

45 plazmidot) EcoRI/HindIII restriktív enzimekkel az enzim gyártójának előírásai szerint felnyitjuk. Az emésztési elegyet 1 tömeg%-os agarózzal elektroforézissel frakcionáljuk. Az etidium-bromid-megfestéssel láthatóvá tett plazmidok kivágjuk, és az agarózzal elektroforézissel eluáljuk. A kapott 20 fmol maradék 50 plazmidot ezután 200 fmol hat DNS-szekvenciának megfelelő DNS-fragmensekkel ligáljuk szobahőmérsékleten egy éjszakán keresztül. Így új pSU18 klónozóvektort (vagy pSU19, M13mUS18 vagy M13mUS19 klónozóvektort) kapunk. A kereskedelmi forgalomban kapható kiindulási plazmidokkal ellentétben az új plazmidok Nco restriktív enzimmel hasíthatók. Az EcoRI és HindIII restriktív enzimek csak egyszer hasítják ezeket a plazmidokat, mivel az EcoRI és HindIII hasítási helyeken keresztül beépített polilinker roncsolja az eredetileg jelen lévő hasítási helyeket. 60

b) *A HMG I–HMG IV génfragmenseket tartalmazó hibrid plazmidok előállítás*

i) *A HMG I génfragmenst tartalmazó plazmid*

A pSU18 plazmidot EcoRI és Nco restrikciós enzimekkel felnyitjuk a 15. példa a) pontjában leírt módon, majd az előzetesen foszforilezett I génfragmenssel ligáljuk.

ii) *A HMG II génfragmenst tartalmazó plazmid*

A HMG II–1, II–2 és II–3 gén szubfragmenseket tartalmazó plazmidokat EcoRI/MluI, MluI/BssHII vagy BssHII/HindIII restrikciós enzimekkel emésztve izoláljuk a HMG II–1, HMG II–2 vagy HMG II–3 génfragmenseket. Ezeket az EcoRI/HindIII enzimekkel felnyitott pSU18 plazmidba ligáljuk a szokásos módon.

iii) *A HMG III génfragmenst tartalmazó plazmid*

A HMG III–1 és III–3 gén szubfragmenseket tartalmazó plazmidokat EcoRI/HindIII restrikciós enzimekkel emésztjük, majd Sau96I enzimmal hasítva izoláljuk a HMG III–1 fragmenst, vagy BamHI/BanII enzimmal hasítva izoláljuk a HMG III–3 génfragmenst. Ezeket a fragmenseket a HMG III–2 fragmenssel a HindIII/BamHI enzimekkel felnyitott pSU18 plazmidba építjük be.

iv) *A HMG IV génfragmenst tartalmazó plazmid*

A HMG–IV–(1+2) és HMG VI–(3+4) gén szubfragmenseket tartalmazó plazmidokat EcoRI/ BamHI és EcoRI/XbaI restrikciós enzimekkel felnyitjuk, és a HMG IV–(1+2) és HMG IV–(3+4) génfragmenseket elektroforézissel tisztítjuk. A kapott fragmenseket ezután BamHI/XbaI enzimekkel felnyitott olyan pSU18 plazmidba ligáljuk, amelyben az EcoRI hasítási helyet előzetesen a később leírt módon S1 nukleázzal roncsoltuk. Így olyan hibrid plazmidot kapunk, amely a négy DNS-szekvenciában egy további AATT nukleotidszekvenciát tartalmaz. A hibrid plazmidot ezen a ponton EcoRI enzimmal emésztve felnyitjuk, és a túlnyúló AATT végeket S1 nukleázzal eltávolítjuk. Ehhez 1 µg plazmidot az EcoRI emésztés után két egység S1 nukleázzal inkubálunk 50 mmol/l nátrium-acetát-pufferben (pH=4,5), amely 200 mmol/l nátrium-kloridot és 1 mmol/l cink-kloridot tartalmaz. Az inkubálást 30 percen keresztül 20 °C hőmérsékleten végezzük. A plazmidot a tompa végeken keresztül a szokásos módon körbezárjuk. Így olyan hibrid plazmidot kapunk, amely tartalmazza a IV génfragmenst.

c) *Az V képletű DNS-szekvenciát tartalmazó pUH10 hibrid plazmid előállítás*

A HMG I génfragmenst tartalmazó hibrid plazmidot EcoRI/HindIII enzimekkel felnyitjuk, és a megfelelő

hibrid plazmid EcoRI/HindIII emésztésével kapott HMG II fragmenssel ligáljuk. A kapott plazmidot ezután HindIII/BamHI enzimekkel felnyitjuk, és a megfelelő plazmid HindIII/BamHI emésztésével kapott HMG III fragmenssel ligáljuk. Az így kapott plazmidot BamHI/XbaI enzimekkel felnyitjuk, és a megfelelő plazmid BamHI/XbaI emésztésével kapott HMG IV fragmenshez kapcsoljuk. Így pUH10 hibrid plazmidot kapunk, amely tartalmazza az V képletű DNS-szekvenciának megfelelő teljes HMG gént. A 2. ábra mutatja a pUH10 hasítási térképét, amelyben az „ori” és „Ap^r” jelölések mutatják a pUC18 plazmidnak megfelelő eredeti orientációt.

Ha a pINTLI plazmidot BstEII és XbaI enzimekkel hasítjuk, és a nagy fragmenst izoláljuk, és ha a pUH10 plazmidot (2. ábra) ugyanezekkel az enzimekkel emésztjük, és az V képletű DNS-szekvencia nagy részét tartalmazó fragmenst izoláljuk, a két fragmens ligálásával kapott plazmid olyan fúziós fehérjét kódol, amelyben arginin követi az első nyolc aminosavat a pINT41d plazmid ballaszt szekvenciájában (1. táblázat), és amelyet a Leu³mal kezdődően a HMG CoA reduktáz aktív doménjének struktúrgénje követ. Összehasonlítási célból a két kezdeti plazmidot Nco és XbaI enzimekkel hasítjuk, és a megfelelő fragmenseket ligáljuk. A kapott plazmid közvetlenül a start kodon után a HMG CoA reduktáz aktív doménjét kódolja (a 292 803 számú európai közrebocsátási irat szerinti V képletű DNS-szekvenciának megfelelően, lásd a 3. táblázatot).

A kódolt fehérjék kifejezését a 4. példában leírt módon végezzük. A sejtek feltörése után centrifugálunk, majd a feltételezések szerint mintegy 55 kDa méretű fehérjét a felülúszóban gélelektroforézis alapján kimutatjuk. A fúziós fehérje sávja sokkal intenzívebb, mint a közvetlenül kifejezett fehérje sávja. A felülúszó 100 µl-es részleteiben a mevalonát képződését vizsgáljuk hígítatlan formában, 1:10 és 1:100 hígításban. További összehasonlításhoz a 4. példa szerinti fúziós fehérje (proinzulinrészt tartalmazó fúziós fehérje) vizsgáljuk, amikor is a fent említett három koncentrációban aktivitás nem mutatható ki. A HMG CoA reduktáz tartalmazó fúziós fehérje mindhárom hígításban maximális aktivitást mutat, míg a közvetlen kifejeződés terméke a koncentráció által szabályozott lépcsőzetes aktivitást mutat. Ez azt jelenti, hogy a fúziós fehérje legalább százszoros faktoral jobban kifejeződik.

3. táblázat

5' CATG GTT CTG GTT ACC CAG GAA CCT GAA ATT GAA CTT CCG CGG GAA CCT CGG CCT AAT GAA GAA TGT CTA CAG ATC CTT GGT AAT GCA GAG

10 20

Met Val Leu Val Thr Glu Val Thr Glu Ile Ile Glu Ile Ile Glu Leu Val Thr Glu Ile Ile Glu Cys Leu Glu Ile Ile Leu Gly Asn Ala Glu

30 40 50

Lys Gly Ala Lys Phe Leu Ser Asp Ala Glu Ile Ile Glu Leu Val Asn Ala Lys His Ile Pro Ala Tyr Lys Leu Glu Thr Leu Met Glu

AAA GGT GCA AAG TTC CTT AGT GAC GCC GAG ATC ATC CAG TTA GTG AAT GCT AAA CAT ATC CCA GCT TAC AAG CTC GAG ACT CTG ATG GAA

60 70 80

Thr His Glu Arg Gly Val Ser Ile Arg Arg Glu Leu Leu Ser Lys Lys Leu Ser Glu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr Leu Pro Tyr Arg Asp

ACT CAT GAG CGT GGT GTA TCG ATT CGC CGA CAG TTA CTT TCG AAG AAA CTT TCT GAA CCG ACC TCT CTC CAG TAT CTG CCT TAT CGC GAT

90 100 110

Tyr Asn Tyr Ser Leu Val Met Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met Pro Ile Pro Val Gly Val Ala Gly Pro Leu Cys Leu

TAT AAT TAC TCT TTG GTG ATG GGA GCC TGT TGT GAG AAT GTT ATT GGA TAT ATG CCC ATC CCT GTG GCA GTG GCA GGA CCT CTT TGC TTG

3. táblázat (folytatás)

120	130	140
ASP GLU LYS GLU PHE GLN VAL PRO MET ALA THR THR GLU GLY CYS LEU VAL ALA SER THR ASN ARG GLY CYS ARG ALA ILE GLY LEU GLY		
GAT GAA AAA GAA TTC CAG GTT CCA ATG GCA ACA ACA GAA GGT TGT CTT GTG GCT AGC ACC AAT AGA GGT TGC AGA GCG ATC GGT CTT GGT		
150	160	170
GLY GLY ALA SER SER ARG VAL LEU ALA ASP GLY MET THR ARG GLY PRO VAL ARG LEU PRO ARG ALA CYS ASP SER ALA GLU VAL LYS		
GGA GGT GCC AGC TCC CGA GTT CTT GCA GAT GGT ATG ACG CGT GGC CCA GTT GTG CGT CTT CCA AGG GCT TGT GAC TCT GCA GAA GTG AAA		
180	190	200
ALA TRP LEU GLU THR SER GLU GLY PHE ALA VAL ILE LYS GLU ALA PHE ASP SER THR SER ARG PHE ALA ARG LEU GLN LYS LEU HIS THR		
GCA TGG CTC GAA ACA TCC GAA GGG TTC GCA GAG GAG GCA TTT GAC AGC ACT AGC AGA TTT GCG CGC CTT CAG AAA CTT CAT ACT		
210	220	230
SER ILE ALA GLY ARG ASN LEU TYR ILE ARG PHE GLN SER ARG SER GLY ASP ALA MET GLY MET ASN MET ILE SER LYS GLY THR GLU LYS		
AGT ATC GCT GGA CGC AAC CTT TAT ATC CGT TTC CAG TCC AGA TCT GGT GAC GCA ATG GGT ATG AAC ATG ATA TCT AAG GGC ACA GAG AAA		

3. táblázat (folytatás)

240	250	260
ALA LEU SER LYS LEU HIS GLU TYR PHE PRO GLU MET GLN ILE LEU ALA VAL SER GLY ASN TYR CYS THR ASP LYS LYS PRO ALA ALA ILE		
GCA CTT TCC AAG CTT CAC GAG TAT TTT CCG GAA ATG CAG ATT CTG GCT GTT AGT GGT AAC TAT TGT ACT GAC AAG AAA CCT GCT GCT ATC		
270	280	290
ASN TRP ILE GLU GLY ARG GLY LYS SER VAL VAL CYS GLU ALA VAL ILE PRO SER LYS VAL VAL ARG GLU VAL LEU LYS THR THR THR GLU		
AAT TGG ATT GAG GGC CGT GGA AAA TCT GTT GTT GAA GCT GTA ATT CCA AGC AAG GTT GTT AGA GAA GTT TTA AAG ACT ACC ACA GAG		
300	310	320
ALA MET ILE GLU VAL ASN ILE ASN LYS ASN LEU VAL GLY SER ALA MET ALA GLY SER ILE GLY TYR ASN ALA HIS ALA ALA ASN ILE		
GCT ATG ATT GAG GTT AAT ATT AAC AAG AAT TTA GTG GGC TCT GCA ATG GCT GGT AGC ATC GGA GGC TAC AAC GCT CAT GCT GCA AAC ATT		
330	340	350
VAL THR ALA ILE TYR ILE ALA CYS GLY GLN ASP ALA ALA GLN ASN VAL GLY SER SER ASN CYS ILE THR LEU MET GLU ALA SER GLY PRO		
GTC ACC GCT ATC TAC ATT GCT TGT GGC CAG GAC GCA GCT CAG AAT GTT GGA TCC TCT AAC TGT ATT ACT TTA ATG GAA GCC TCA GGT CCG		

3. táblázat (folytatás)

360
 THR ASN GLU ASP LEU TYR ILE SER CYS THR MET PRO SER ILE GLU ILE GLY THR VAL GLY THR ASN LEU LEU PRO GLN GLN ALA
 ACA AAT GAA GAT TTA TAT ATC AGC TGC ACC ATG CCA TCT ATC GAG ATT GGT ACC GTG GGT GGC ACC AAC CTT CTT CCA CAG CAG GCC

370

380

390
 CYS LEU GLN MET LEU GLY VAL GLN GLY ALA CYS LYS ASP ASN PRO GLY GLU ASN ALA ARG GLN LEU ALA ARG ILE VAL CYS GLY THR VAL
 TGT CTG CAA ATG TTG GGT GTT CAA GGA GCA TGC AAA GAT AAT CCT GGC GAA AAT GCC CGG CAA CTT GCA CGA ATT GTG TGT GGG ACC GTA

400

410

420
 MET ALA GLY GLU LEU SER LEU MET ALA ALA LEU ALA ALA GLY HIS LEU VAL LYS SER HIS MET ILE HIS ASN ARG SER LYS ILE ASN LEU
 ATG GCC GGC GAA TTG TCT CTT ATG GCT GCC TTG GCG GCC GGA CAT CTT GTC AAA TCT CAT ATG ATT CAC AAC CGT TCG AAG ATC AAT TTA

430

440

450
 GLN ASP LEU GLN GLY ALA CYS THR LYS LYS THR ALA --- ---
 CAG GAT CTG CAA GGC GCT TGC ACC AAG AAG ACA GCA TAA TAG T

460

XbaI

16. példa

pB70 plazmid előállítás

A pINT41d plazmidot MluI és SalI enzimekkel hasítjuk, és a nagy fragmenst izoláljuk. A 3a. ábrán bemutatott pIK4 plazmid mini proinzulint kódoló gént tartalmaz, amelynek C láncra csak arginint tartalmaz.

A plazmid előállítását a 347781 számú európai közrebocsátási irat ismerteti. Röviden, a kereskedelmi pUC19 plazmidot KpnI és PstI restriktív enzimekkel felnyitjuk, és a nagy fragmenst [3. ábra, (1) fragmens] 0,1 tömeg% Seaplaque géllal elválasztjuk. Ezt a fragmenst T4 DNS-ligázzal reagáltatjuk a 4. táblázat szerint szintetizált DNS [3. ábra, (2) DNS] jelenlétében. A 4. táblázat az IK I génfragmens szekvenciáját mutatja, míg az 5. táblázat az IK II génfragmens szekvenciáját tartalmazza.

Ezt a ligálóelegyet ezután kompetens *E. coli* 79/02 sejtekkel inkubáljuk. A transzformációs elegyet

B30	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	(10)		
(Thr)	(Arg)	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	(Thr)	(Ser)		
5'	CG	CGT	GGT	ATC	GTT	GAA	CAA	TGT	TGT	A	3'	
3'		A	CCA	TAG	CAA	CTT	GTT	ACA	ACA	TGA	TG	5'
(MluI)											(SpeI)	

amely argininkodonnal kiegészíti a B lánc utolsó kodonját (B30), és helyettesíti az A lánchoz tartozó első hét aminosav kihatott kodonját, és pótolja ugyanezen lánc 8 és 9 aminosavának megfelelő kodont. A pIK4 plazmid (3a. ábra) humán mini proinzulint kódol.

A 4. és 5. táblázatban az inzulinmolekula B és A lánca az első és utolsó aminosav jelöli. Az IK II génfragmens kódolószakasza mellett SalI hasítóhely található, amelyet a következő szerkezetben alkalmazunk.

A pIK4 plazmidot HpaI és SalI enzimekkel hasítjuk, és a mini proinzulint kódoló gént izoláljuk. Ezt a gént a pINT41d fent említett nagy fragmensével és a következő szintetikus DNS-szekvenciával ligáljuk.

IPTG/Xgal lemezekre szélesztjük, amelyek 20 mg/l ampicillint tartalmaznak. A plazmid DNS-t a fehér telepekből izoláljuk, és restriktív és DNS-szekvenáló analízissel jellemezzük. A kívánt plazmidok a pIK1 nevet (3. ábra) kapják.

Ennek megfelelően az 5. táblázat szerinti DNS-t [3. ábra, (5) DNS] PstI és HindIII enzimekkel felnyitott pUC19 plazmidba ligáljuk [3. ábra, (4)]. Így pIK2 plazmidot (3. ábra) kapunk.

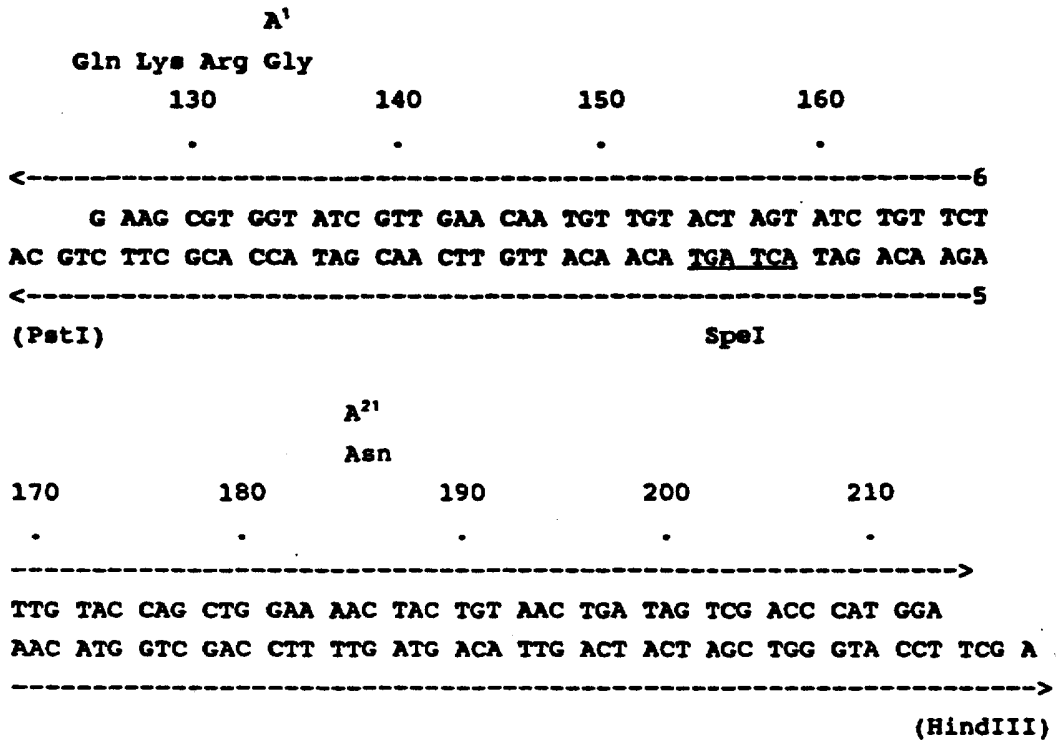
A 3. ábra (2) és (5) DNS-szekvenciáját, amelyek a 4. és 5. táblázatnak felelnek meg, izoláljuk a pIK1 és pIK2 plazmidokból és KpnI és HindIII enzimekkel felnyitott pUC19 plazmidba ligáljuk [3. ábra, (7)]. Az így kapott pIK3 plazmid (3. ábra) módosított humáninzu-

lin-szekvenciát kódol. A pIK3 plazmidot MluI és SpeI enzimekkel felnyitjuk, és a nagy fragmenst [3a. ábra, (9) fragmens] izoláljuk. Ezt (10) DNS-szekvenciával ligáljuk,

B'	A'	A'	A'	A'	A'	A'
(Thr)	Arg	Met	Gly	Arg	Phe	
CG	CGT	ATG	GGC	CGT	TTC	GTT
	A	TAC	CCG	GCA	AAG	CAA
(MluI)						(HpaI)

Így pB70 plazmidot kapunk, amely olyan fúziós fehérjét kódol, amelyben a ballasztrészt (1. táblázat 1. vonal) Met-Gly-Arg aminosavszekvencia, és ezt a mini proinzulin aminosavszekvenciája követi.

5. táblázat



17. példa

Az alábbi oligonukleotidokkal pINT90d–pINT96d plazmidokat állítunk elő az előbbi példákban megadott módon. Az oligonukleotidoknál * jelöli a pINT41d bal-lasztrészével azonos aminosavakat.

A pINT92 a pINT72d plazmid által kódolt inzulin-származék kettős mutációját kódolja, mivel a ballasztrész végén és a mini C láncban található Arg kodont Met kodon helyettesíti. Ennek következtében a kifejezett előtermék cián-bromiddal hasítható.

pINT90d: *****GNSA* (pINT69d változat)

TIR: 5'-CTGAAATGAGCTGTTGAC-3'

és

Insu50: 5'-TGCCGAATTTCTGTTGATGTTGTTGC-3'

vagy

Insu49: 5'-GGAAATTCGGCACGATTTGTGAACCAG-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

pINT91d: *****GNSA* (pINT72d változat)

TIR: 5'-CTGAAATGAGCTGTTGAC-3'

és

Insu50: 5'-TGCCGAATTTCTGTTGATGTTGTTGC-3'

vagy

Insu49: 5'-GGAAATTCGGCACGATTTGTGAACCAG-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

pINT92d: (pINT72d kettős mutáns)

Insu56: 5'-TCGACCATGGCAACAACATCAACAATGTTTGTG-3'

és

Insu58: 5'-GATGCCCATGGTCTT-3'

vagy

Insu57: 5'-AAGACCATGGGCATC-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

pINT93d: ***** (pINT68d változat)

Insu53: 5'-ACCATGGCAACAACATCAACAAAACGATTTGTG-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

pINT94d: ***** (pINT68d változat)

Insu54: 5'-ACCATGGCAACAACATCAACACCACGATTTGTG-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

pINT95d: ***** (pINT68d változat)

Insu55: 5'-TCGACCATGGCAACAACATCAACAATGCGATTTGTG-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

pINT96d: ***** (pINT68d változat)

Insu71: 5'-ACCATGGCAACAACATCAACAGGACGATTTGTG-3'

és

Insu11: 5'-TCATGTTTGACAGCTTATCAT-3'

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás valamely kívánt fehérjéből és egy ballasztrészből álló fúziós fehérjék előállítására, *azzal jellemezve, hogy*

a) ballasztrészt kódoló kevert oligonukleotidot állítunk elő, ahol az oligonukleotid DNS-szekvenciája (kódolószál)



részt tartalmaz, ahol

D jelentése A, G vagy T és

x értéke 4–12,

és ahol az oligonukleotid legfeljebb 100 nukleotidot tartalmaz,

b) a kevert oligonukleotidot vektorba építjük oly módon, hogy funkcionálisan kapcsolódjon egy szabályozószakaszhoz, és a kívánt fehérjét kódoló struktúrgénhez,

c) a kapott vektorpopulációval gazdasejteket transzformálunk,

d) a transzformánsokból egy vagy több olyan klónt szelektálunk, amelyek a fúziós fehérjét nagy kitermeléssel kifejezik, és

e) a fúziós fehérjét kifejezzük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amely a kódolószál 3'-végén a kívánt fehérjének a ballasztrésztől történő könnyű lehasítását lehetővé tévő hasítóhelyet eredményező aminosavat vagy aminosavcsoport kódol.*

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy enzimátikus hasítóhelyet kódoló oligonukleotidot alkalmazunk.*

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amely viszonylag hidrofíl aminosavszekvenciát kódol, és így oldható vagy könnyen szolubilizálható fúziós fehérjét eredményez.*

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amelynél a ballasztrész nem befolyásolja a kívánt fehérje hajtogatását.*

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol x értéke 4–8.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy az oligonukleotid*



szekvenciát (kódolószál) tartalmaz, ahol

5 N jelentése az NNN-re vonatkozó stop kodontól eltérő, azonos vagy különböző nukleotid,

z értéke 1–4, és

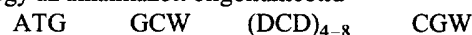
y+z értéke 6–12, ahol

y értéke legalább 4.

10 8. A 7. igénypont szerinti eljárás, ahol y+z értéke 6–10.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, ahol y értéke 5–8, és z értéke 1.

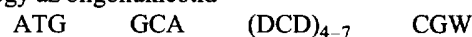
15 10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy az alkalmazott oligonukleotid*



szekvenciát (kódolószál) tartalmaz, ahol

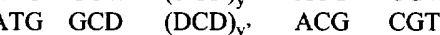
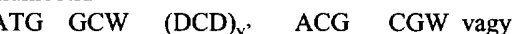
W jelentése A vagy T.

20 11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy az oligonukleotid*



szekvenciát tartalmaz.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a kívánt fehérje proinzulin, és az alkalmazott oligonukleotid*



szekvenciát (kódolószál) tartalmaz, ahol

D jelentése A, G vagy T,

30 W jelentése A vagy T és

y' értéke 3–6.

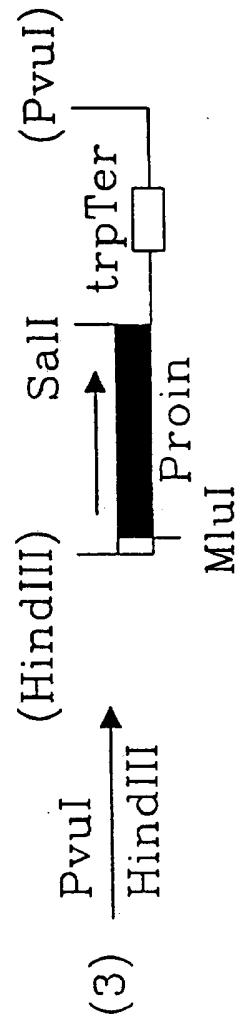
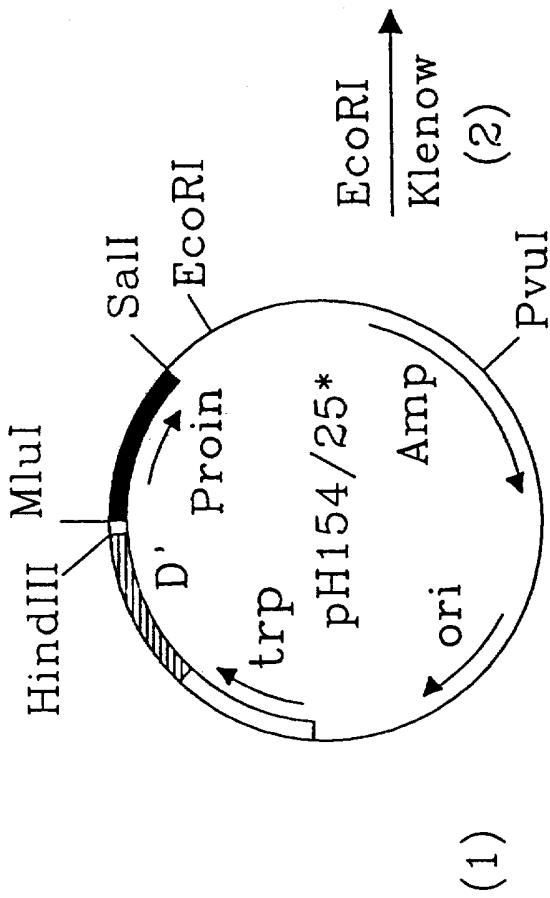
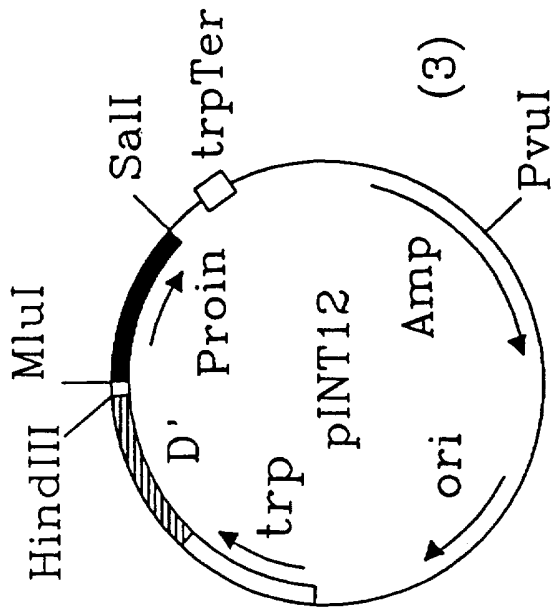
13. A 12. igénypont szerinti eljárás, ahol y' értéke 4–6.

14. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a kívánt fehérje proinzulin.*

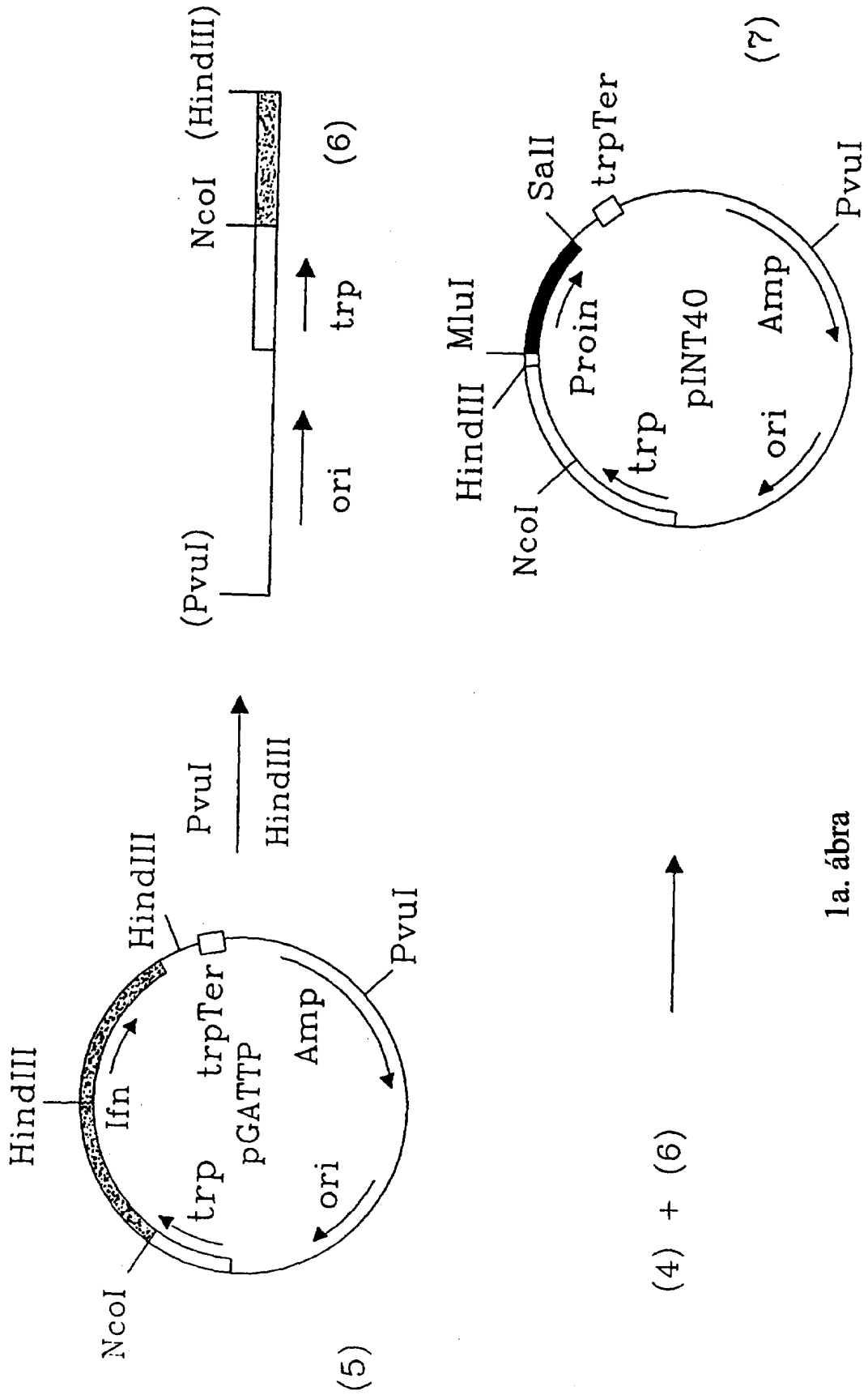
15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a proinzulin a humán proinzulintól eltérő C láncot tartalmaz.*

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a ballasztrésszel együtt történő lehasítást biztosító hasítóhelyet tartalmazó, C láncot kódoló gént alkalmazunk.*

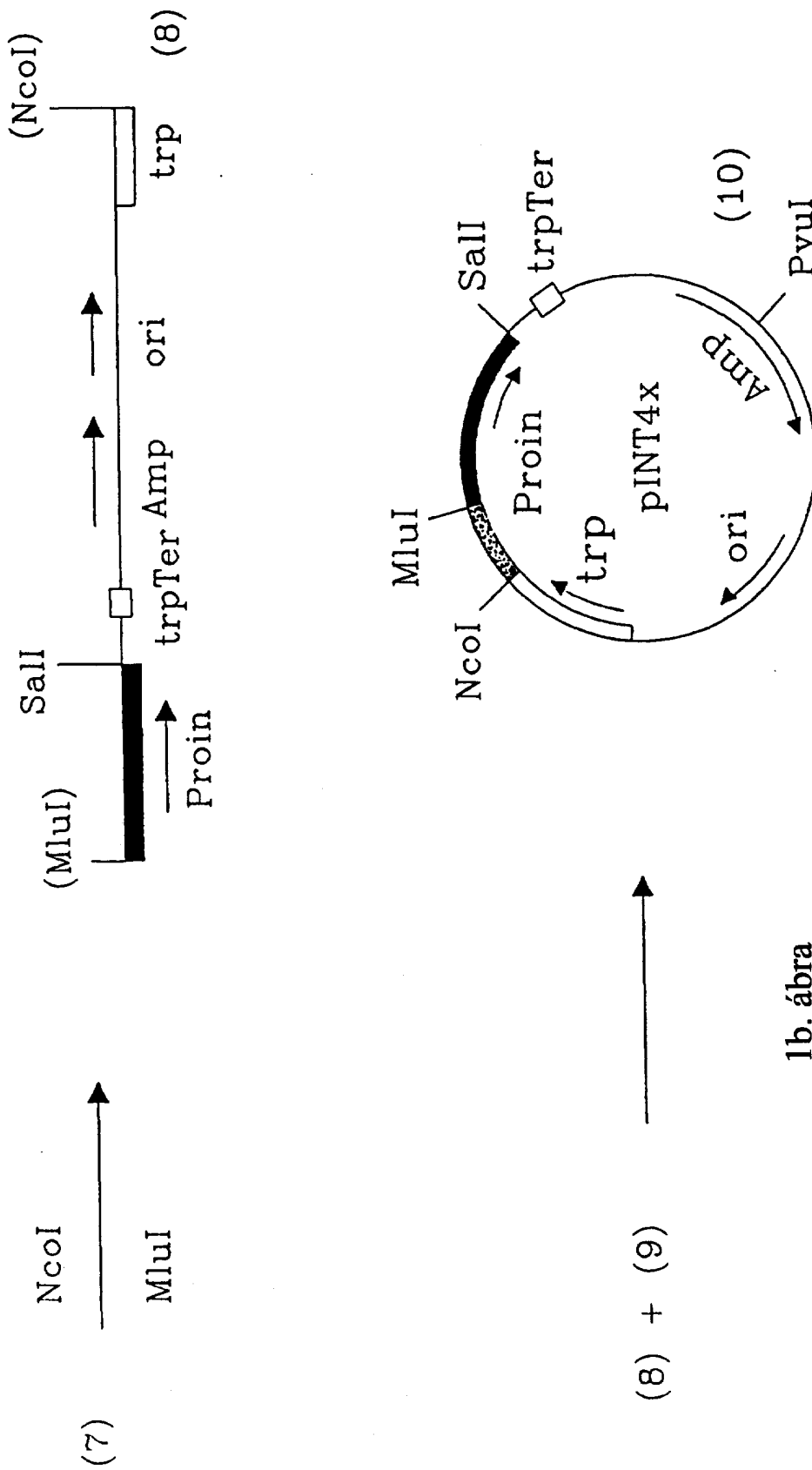
17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a C lánc arginint tartalmaz.*



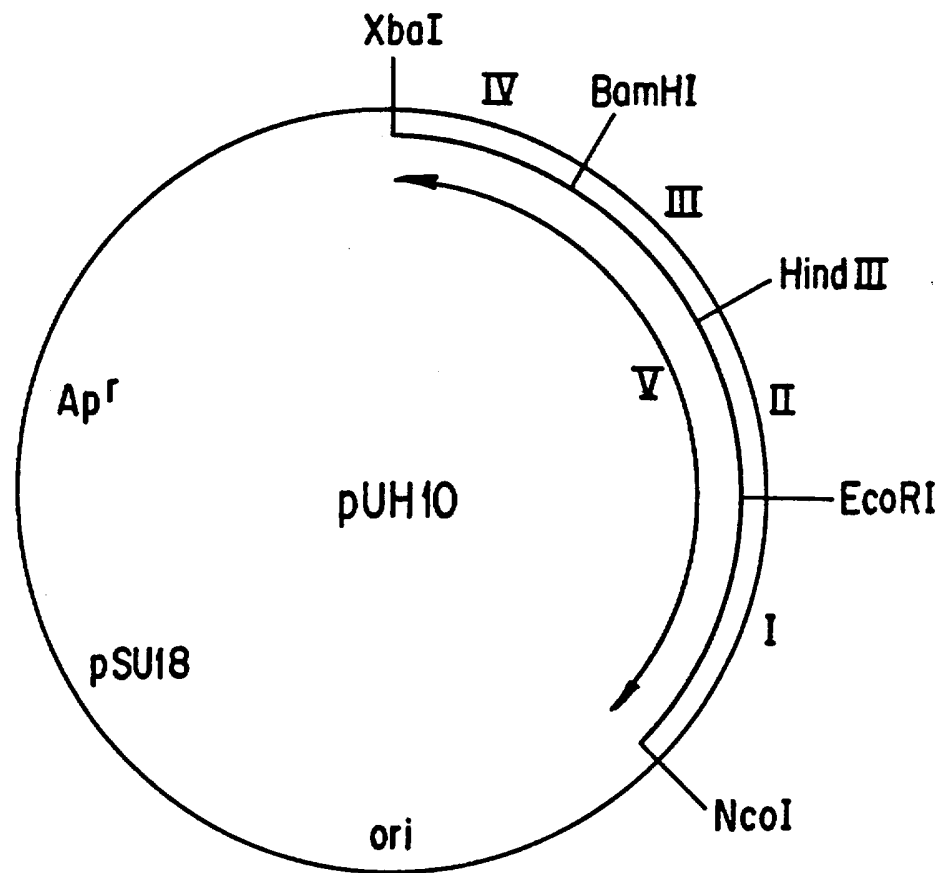
1. ábra



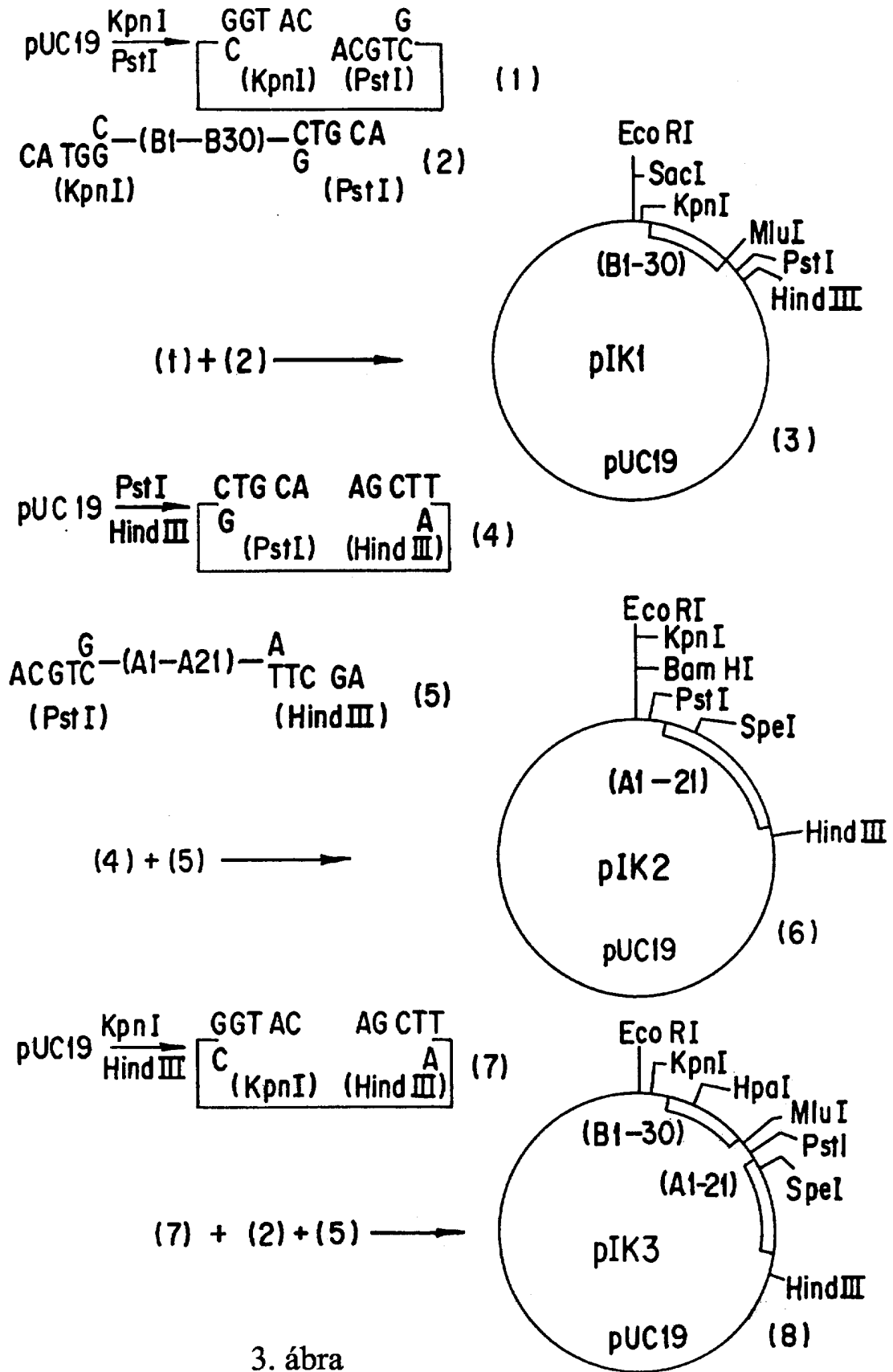
1a. ábra



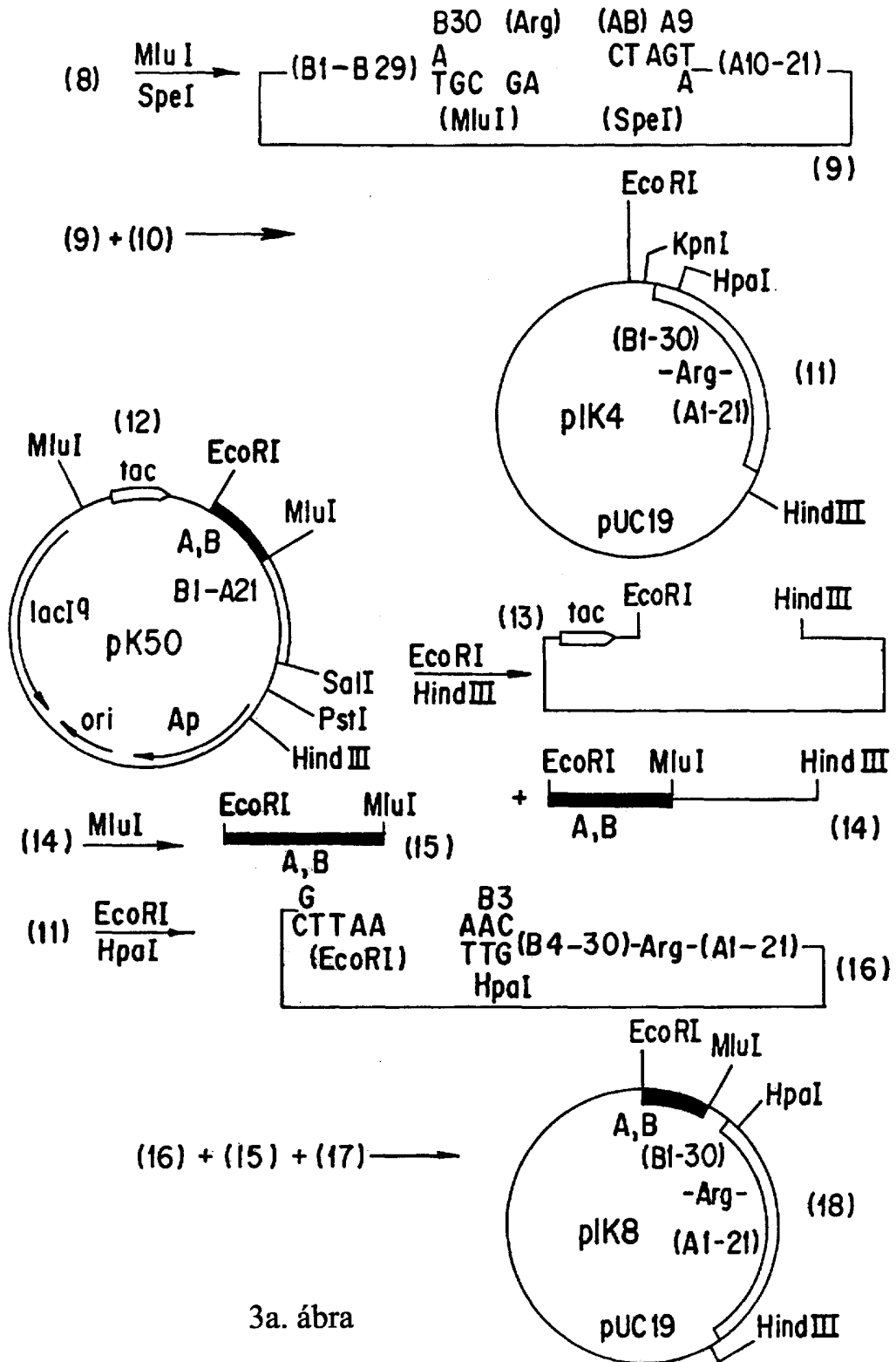
1b. ábra



2. ábra



3. ábra



3a. ábra