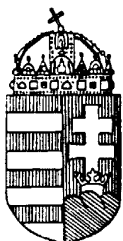


(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám

202281 B

(22) Bejelentés napja: 1985. 03. 05. (21) (835/85)

Bejelentés elsőbbsége: (33) 1984. 03. 06.
1984. 07. 26.
1985. 01. 31.

(32) US

(31) 586 582

634 920

697 090

(83) Figyelembe vett nyomtatványok: NRRL B 15011
NRRL B 15733

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1991. 02. 28.

(51)

NSZO₅
C12N 15/64
C12P 21/00

(72) Feltaláló(k):
HSIUNG Hansen Maxwell Indianapolis
SCHONER Brigitte Elisabeth
Zionsville, Indiana, US

(73) Szabadalmas:
Eli Lilly and Company,
Indianapolis, Indiana, US

(74) Képviselő:
Budapesti NÜMK

(54) ELJÁRÁS SZELEKTÁLHATÓ ÉS ÖNÁLLÓAN REPLIKÁLHATÓ REKOMBINÁNS DEZOXI-RIBONUKLEINSAV EXPRESSZIÓS VEKTOROK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás szelektálható és autonóm replikálódó rekombináns dezoxi-ribonukleinsav expressziós vektorok előállítására.

Úgy járnak el, hogy

a) egy, példányszám szabályozását indukálhatóan elvesztő, úgynevezett „runaway” replikont, és

b) egy biológiailag aktív szarvasmarha növekedési hormon származékot kódoló génnel leolvasási fázisban levő transzkripció és transláció aktivációs ligálnak.

Az előállított szelektálható, önállóan replikálódó expressziós vektorokkal transzformált sejtek a példányszám szabályozásának hiányában jelentős mértékben fejezik ki például a szarvasmarha növekedési hormont megfelelő körülmények között tenyésztve a transzfománsokat.

A leírás terjedelme: 48 oldal, 16 ábra

HU 202281 B

A találmány tárgya eljárás szelektálható és önállóan replikálódó rekombináns dezoxi-ribonukleinsav expressziós vektorok előállítására, melynek során ligálunk egy biológiailag aktív szarvasmarha növekedési hormon-származékot kódoló génnel leolvasási fázisban lévő transzkripció és transláció aktivációs szekvenciát egy „runaway” replikonnal.

1980-ban Miller és munkatársai: *De Journal of Biological Chemistry*, 255(16):7521 leírták a szarvasmarha növekedési hormon kódoló szekvenciáját. A 047 600 számú európai nyilvánossághozzártali irat ugyancsak közölte ezt a szekvenciát. Egyik fenti irodalmi hely sem írt azonban le olyan, a jelen találmány szerint alkalmazott szekvenciát, mely szarvasmarha növekedési hormon-származékokat ismertett volna, illetve e származékok előállítását sem ismertették.

A humán növekedési hormon kódoló szekvenciáját Martial és munkatársai (1979), *Science*, 205:602 ismertették. Ez az irodalom sem ismerteti azonban a találmány szerint előállított szarvasmarha növekedési hormon-származékokat. Ugyancsak a szarvasmarha növekedési hormon kódoló szekvenciáját és kifejezését ismertette a 2 073 245A számú nagy-britanniai nyilvánossághozzártali irat, bár a találmány szerinti származékokról ugyancsak nem tettek említést.

A 0085 036 számú európai nyilvánossághozzártali irat szarvasmarhák tejtermelésének fokozására ismert módszer, szarvasmarha növekedési hormon adagolásával, de származékokról ugyancsak nem tesz említést.

Seeburg és munkatársai (1983), *DNA* 2(1):37 szarvasmarha növekedési hormont kódoló módosított DNS szekvenciát tartalmazó plazmidokat ismert, azonban az ott leírt plazmidok eltérnek a találmány szerinti expressziós vektoroktól.

Az 1 557 774 számú brit szabadalmi leírás runaway replikont ismert, mely kiindulási anyagnak alkalmazható a jelen találmány szerinti eljárásban. Ez az irodalom sem ismerteti azonban a találmány szerint létrehozott plazmidokat, származékokat, granulátumokat vagy eljárásokat.

Masui és munkatársai, *The International Journal of Biology and Industry*, January 1984:81 ismertetik az lpp transzkripció és transláció aktivációs szekvenciát. Ezt a szekvenciát a találmány szerinti eljárásban kiindulási anyagnak alkalmazzuk.

Carrier és munkatársai (1933), *Trends in Biotechnology* 1(4):109 runaway replikonokat és különböző termékek, például intracelluláris aggregátumok expresszióját ismertetik rekombináns DNS technikával. A kapott termékek azonban alapvetően eltérnek a leírásban említett granulátumokban található szarvasmarha növekedési hormon-származékoktól.

A 095 361 számú európai nyilvánossághozzártali irat szarvasmarha növekedési hormont tartalmazó kapcsolt terméket kódoló nukleotid szekvenciát ismert. Ez a kapcsolt termék természetes szarvasmarha növekedési hormonból áll, mely az N-terminális végén enterokinázzal történő hasításra érzékeny aminosav-szekvenciát tartalmaz. Ez az irodalom sem ismert azonban találmány szerinti plazmidokat vagy hormon-származékokat.

A találmány új, szelektálható és autonóm replikálódó rekombináns dezoxi-ribonukleinsav kifejező vek-

torokra vonatkozik. A találmány szerinti vektorok tartalmazzak:

1. biológiailag aktív szarvasmarha növekedési hormon-származékot (bGH) meghatározó génnel leolvasási fázisban lévő transzkripció és transláció aktivációs nukleotid szekvenciát, és

2. egy olyan replikont, amely indukált körülmények között elveszti a példányszámot szabályozó képességét.

A találmány továbbá a fenti vektorokkal kapott új transzfóranszformációkra, a szarvasmarha növekedési hormon-származékokra és felhasználásukra vonatkozik.

A bGH termelését elősegítő rekombináns dezoxi-ribonukleinsav technológia fejlődését és elterjedését nagymértékben hátráltatja a génkifejeződés problémaköre. A 0075444 számú közzétételi iratban (európai) részletezett problémák közül az egyik a funkcionálisan szuboptimális mRNS transzkripciója. Ennek a mRNS molekulának nyele és hurokszerkezetei léteznek a szekunder konfigurációban, ezek pedig meghatározzák a normális kötődést a riboszómahoz, és így drasztikus mértékben csökkentik vagy megakadályozzák a bGH kifejeződését. A jelen szabadalmi leírásban megadottak szerint eljárva megoldhatjuk ezt a problémát úgy, hogy a bGH-származékok kifejezésére nagymértékben képes vektorokat használunk.

A leírásban az alábbi, részletesen magyarázott kifejezéseket használjuk.

Rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor: olyan autonóm replikálódó molekula, például plazmid, amely dezoxi-ribonukleinsav molekulához egy vagy több további dezoxi-ribonukleinsav szegmens kapcsolható, vagy amelyhez ilyen szegmenst kapcsolunk.

Rekombináns dezoxi-ribonukleinsav expressziós vektor: olyan rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor, amelybe egy vagy több transzkripció és transláció aktivációs szekvenciát építettünk be.

Transzkripció aktivációs szekvencia: olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely szabályozza vagy lehetővé teszi a dezoxi-ribonukleinsav átírását hírvívó ribonukleinsav transzkriptummá.

Transzláció aktivációs szekvencia: olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely szabályozza vagy lehetővé teszi a hírvívó ribonukleinsav transzkriptum átírását egy peptiddé vagy polipeptiddé.

Transzlációs start jel: olyan dezoxi-ribonukleinsav triplet, amely a translációs start kódot határozza meg.

Transzlációs stop jel: olyan dezoxi-ribonukleinsav triplet, amely egy translációs stop kódot határoz meg.

Transzformáció: dezoxi-ribonukleinsav bejuttatása a recipiens gazdasejtbe, amely ezáltal új genotípust képvisel.

Transzformáns: transzformációt szenvedett recipiens gazdasejt.

Restrikciós fragmens: egy vagy több restrikciós enzim hatása révén generált lineáris dezoxi-ribonukleinsav szekvencia.

Replikon: olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely a rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó és expressziós vektorok replikációját szabályozza.

Elvesztett (runaway) replikon: olyan replikon, amely elvesztette vagy amely indukálhatóan elveszti a példányszámot meghatározó szabályozást, ez a hiány szabályozatlan replikációt eredményez, és annak a dezoxi-

ribonukleinsav molekulának az extrém példányszám növekedését, amelybe ilyen replikont építettünk be.

Funkcionális polipeptid: kinyerhető, biológiailag aktív heterológ polipeptid vagy prekursor, egy kinyerhető, bioaktív, heterológ polipeptidból és homológ polipeptid egy részéből vagy teljes egészéből álló polipeptid, vagy olyan kinyerhető, biológiailag inaktív fúziós polipeptid termék, amely egy heterológ polipeptidból és egy biológiai aktivitást megszüntető polipeptid részből áll, amely utóbbi specifikusan hasítható.

Fuzionált géntermék: olyan kinyerhető, heterológ polipeptid, amely egy homológ polipeptid egy részét vagy teljes egészét tartalmazza.

Az alábbiakban megadjuk a találmányhoz mellékelt ábrák leírását:

1–4. ábra: a PNM575 plazmid előállításának sematikus szemléltetése.

5–8. ábra: a PNM789B plazmid előállításának
schematikus ábrázolása.

9. ábra: a pCZ1920 és pJR1 plazmidok restrikciós térképe.

10. ábra: a pCZ112 plazmid restrikciós térképe.

11. ábra: a timozin alfa 1 szintetikus gén.

12. ábra: a T15 nukleotid fragmens szintézise.

13. ábra: a pTH α 1 plazmid előállítás.

14. ábra: a proinzulin szintetikus gén.

15. ábra: a pHJ7 Δ 4 Δ 1 plazmid előállítása.

16. ábra: a pHI104 plazmid előállítás.

A találmány szelektálható és autonóm replikálódó rekombináns dezoxi-ribonukleinsav expressziós vektorokra vonatozik, amely vektorok tartalmazznak:

a) egy runaway replikont, és

b) egy transzkripció és transzláció aktivációs szekvenciát, amely biológiailag aktív szarvamarha növekedési hormon-származékot meghatározó génnel leolvasási fázisban van, és amely gén az alábbiakban megadott lehet:

(1) 5' ATG AAA GGG AAT TCT ATG GCC TTC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC TTT CCC TTA AGA TAC CGG AAG

CCA GCC ATG TCC TTG TCC GGC 3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| -R-R1
GGT CGG TAC AGG AAC AGG CCG 5'

(2) 5' ATG GAT GAT AAG TTT CCG GCT ATG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC CTA CTA TTC AAA GGC CGA TAC

TCT CTG TCC GGC 3'
||| ||| ||| ||| -R-R1
AGA GAC AGG CCG 5'

(3) 5' ATG TTT CCA GCC ATG GCT CTA
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC AAA GGT CGG TAC CGA GAT

TCT GGT 3'
||| ||| -R-R1
AGA CCA 5'

(4) 5' ATG TTC CCA GCT ATG TCT CTA
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC AAG GGT CGA TAC AGA GAT

TCT GGT 3'
| | | | -R-R1
AGA CCA 5'

5 (5) 5' ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA

10 CTG TCC GGC 3'
 ||| ||| ||| -R-R1
 GAC AGG CCG 5'

(6) 5' ATG TTT CCA GCT ATG TCT CTA
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 15 3' TAC AAA GGT CGA TAC AGA GAT

TCT GGT 3'
||| ||| -R-R1
AGA CCA 5'

(7) 5' ATG GTT TTT CCG GCT ATG TCT
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC CAA AAA GGC CGA TAC AGA

25 CTG TCC GGC 3'
 ||| ||| ||| -R-R1
 GAC AGG CCG 5'

or

(8) 5' ATG GCT TTT CCG GCT ATG TCT
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAC CGA AAA GGC CGA TAC AGA

35 CTG TCC GTC 3'
 ||| ||| ||| -R-R1
 GAC AGG CAG 5' aho:

40 A dezoxi-adenil-csoport,
G dezoxi-guanil-csoport,
C dezoxi-citidil-csoport,
T timidilcsoport,
R egy olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia,
amely a szarvasmarha növekedési hormon 9 (leucin)-
45 191 (fenil-alanin) aminosavát kódolja, továbbá, ahol
R¹ olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely
egy transzlációs stop jelet határoz meg, és amely az
alábbi lehet:

50 5' TAA 3' 5' TAG 3'
 ||| |||
 3' ATT 5' 3' ATC 5', vgy

55 5' TGA 3'
 | | |
 3' ACT 5'.

60 A találmány vonatkozik továbbá a fentiekben ismertetett transzfománsaira, az új vegyületekre, termékekre és ezek felhasználására.

A találmány értelmében az alábbi XbaI-HgiAI dezoxi- ribonukleinsav linker szekvenciákat egymástól függetlenül ligáljuk a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-XbaI és a 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI fragmenseihez.

- a) 5' CTAGAGGGTATTAATA ATG AAA GGG AAT TCT ATG
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 TCCCATAATTAT TAC TTT CCC TTA AGA TAC

 GCC TTC CCA GCC ATG TCC TTG TCC GGC CTG
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 CGG AAG GGT CGG TAC AGG AAC AGG CCG GAC

 TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 AAA CGG TTG CGA C 5'
- b) 5' CTAGAGGGTATTAATA ATG TTT CCA GCC ATG GCT
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3' TCCCATAATTAT TAC AAA GGT CGG TAC CGA

 CTA TCT GGT CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 GAT AGA CCA GAC AAA CGG TTG CGA C 5'
- c) 5' CTAGAGGGTATTAATA ATG TTT CCA GCT ATG TCT
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3' TCCCATAATTAT TAC AAA GGT CGA TAC AGA

 CTA TCT GGT CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 GAT AGA CCA GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

A kapott, sorrendben pCZ1920, pJR1 és pAT2 plazmidoknak nevezett termék tartalmazza:

1. az E. coli lipoprotein gén transzkripció és transláció aktivációs szekvenciáját [Nakamura és Inouye, Cell, 18, 1109 (1979)] egy biológiailag aktív szarvasmarha növekedési hormon- származékot meghatározó kódoló szekvenciával leolvasási fázisban;

2. egy megfelelően elhelyezett translációs stop jelet, és

3. egy úgynevezett runaway replikont.

A pCZ1920, pJR1 és pAT2 plazmidokkal transzformált sejtek sorrendben az alábbi proteinek fejezik ki:

MET-LYS-GLY-ASP-N-SER-MET-ALA-bGH-MET-PHE-PRO-ALA-MET-ALA-R² és MET-bGH, ahol
 MET metionin,
 LYS lizin,
 GLY glicin,
 ASPN aszparagin,

30 SER szerin,
 ALA alanin,
 PHE fenil-alanin,
 PRO propil,
 bGH olyan szarvasmarha növekedési hormont reprezentáló természetes aminosav szekvencia, amely az N-terminálisa (az első) fenil-alaninnal kezdődik,
 35 R² a szarvasmarha növekedési hormon természetes aminosav szekvenciája, amely a 6. aminosavval (leucin) kezdődik az N- terminális végtől számítva.
 A mellékelt 9. ábrán adjuk meg a pCZ1920 és a pJR1 plazmidok restrikciós térképét.
 A találmány oltalmi körébe tartozó további plazmidokat állíthatunk elő úgy, hogy egymástól függetlenül ligáljuk az alábbi TaqI-HgiAI dezoxi-ribonukleinsav linker szekvenciákat a pCZ101 plazmid 10 kb nagyságú EcoRI-BamHI és 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI fragmenseihez vagy a pNM608 plazmid 0,29 kb nagyságú EcoRI-ClaI fragmenséhez:

- a) 5' CGACC ATG GAT GAT AAG TTT CCG GCT ATG TCT
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3' TGG TAC CTA CTA TTC AAA GGC CGA TAC AGA

 CTG TCC GGC CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 GAC AGG CCG GAC AAA CGG TTG CGA C 5'
- b) 5' CGACA ATG TTC CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3' TGT TAC AAG GGT CGA TAC AGA GAT AGA CCA

 CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

c) 5' CGACC ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGG TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG

GGC CTG TTT CGC AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 CCG GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

d) 5' CGATC ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 TAG TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG

GGC CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 CCG GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

e) 5' CGACC ATG GTT TTT CCG GCT ATG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGG TAC CAA AAA GGC CGA TAC

TCT CTG TCC GGC CTG TTT GCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 AGA GAC AGG CCG GAC AAA CGG

AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| |||
 TTG CGA C 5'

f) 5' CGACC ATG GCT TTT CCG GCT ATG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGG TAC CGA AAA GGC CGA TAC

TCT CTG TCC GTC CTG TTT GCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 AGA GAC AGG CGA GAC AAA CGG

AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| |||
 TTG CGA C 5'

g) 5' CGATA ATG GAT TTT CCG GCT ATG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TAT TAC CTA AAA GGC CGA TAC

TCT CTG TCC GGC CTG TTT GCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 AGA GAC AGG CCG GAC AAA CGG

AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| |||
 TTG CGA C 5'

ahol:

A dezoxi-adenil-csoport,
 G dezoxi-guanil-csoport,
 C dezoxi-citidil-csoport, és
 T timidilcsoport.

A kapott plazmidoknak az alábbi jeleket adjuk:
 pCZ112, pAT1, pASP1, pASP2, pCZ154, pCZ155 60
 illetve pCZ156. Ezek a plazmidok tartalmazzák:

1. az E. coli triptofán génjének transzkripció és
 transzláció aktivációs szekvenciáját [Hallewell és
 Emtage, Gene, 9, 27 (1980)] egy biológiailag aktív
 szarvasmarha növekedési hormon- származékot meg- 65

határozó kódoló szekvenciával leolvasási fázisban;
 2. egy megfelelően elhelyezett transzlációs stop
 jelet, és

3. egy runaway replikont.

A pCZ112, pAT1, pASP1, pASP2, pCZ154,
 pCZ155 illetve pCZ156 plazmidokkal transzformált
 sejtek sorrendben az alábbi proteineket fejezik ki:

MET-ASP-ASP-LYS-bGH, MET-bGH, MET-ASP-bGH, MET-ASP-bGH, MET-VAL-bGH, MET-ALA-PHE-PRO-ALA-MET-SER-LEU-SER-VAL-b'GH

ahol

MET metionin,
ASP aszparaginsav,
LEU leucin,
SER szerin,
PRO prolin,
PHE fenil-alanin,
LYS lizin,
VAL valin,
ALA alanin,

b'GH olyan szarvasmarha növekedési hormon természetes aminosav szekvencia, amely a 9., leucin aminosavval kezdődik, továbbá, ahol

bGH olyan szarvasmarha növekedési hormon természetes aminosav szekvencia, amely az N-terminális (első) fenil-alaninnal kezdődik.

A szemléltető jelleggel bemutatott pCZ112 plazmid restrikciós térképét a mellékelt 10. ábrán adjuk meg.

A pCZ101 kiindulási plazmid 10,8 kb nagyságú és úgy állítjuk elő, hogy a pNM789B plazmid 0,6 kb nagyságú XbaI-BamHI fragmensét ligáljuk a hasonlóképpen emésztett pIM-I'-A3 plazmiddal. Az utóbbi plazmid tartalmazza a transzlációs és transzkripció aktivációs szekvenciáját az E. coli lipoprotein gén működéséhez, tartalmaz egy, a példányszámot meghatározó replikont, a plazmidot magát az E. coli K12RV308/pIM-I'-A3 törzsből kapjuk. Ezt a törzset letétbe helyeztük a Northern Regional Research Laboratory törzsgyűjteményében, Peoria, Illinois. A plazmidot NRRL B-15733 sorszám alatt megrendelhető törzsből izolálhatjuk.

A pNM789B plazmid a pKEN111 plazmidból származik az 1-8. példában megadottak szerint végzett kísérletek szerint, illetve az 1. példában megadott technikát használva. A pKEN111 plazmidot az E. coli K12 CC620/pKEN111 törzsből izolálhatjuk, a törzset a Northern Regional Research Laboratory törzsgyűjteményében helyeztük letétbe, Peoria, Illinois. A plazmid forrásaként szereplő törzset az alábbi sorszámon tartják nyilván: NRRL B-15011. A pNM789B plazmid szintén tartalmazza az E. coli lipoprotein gén transzkripció és transzlációs aktivációs szekvenciákat, és ezenkívül egy olyan kódoló szekvenciát a transzlációs stop jellel együtt, amely a bGH-t és a bGH N-terminális végénél elhelyezkedő 9-tagú polipeptidből álló fúziós proteint határoz meg. Az XbaI-BamHI fragmenst tartalmazó és a fúziós proteint leíró kódoló szekvenciát a megfelelően hasított pIM-I'-A3 plazmidhoz ligálva megkapjuk az előzőekben ismertetett pCZ101 plazmidot.

A pNM608 kiindulási plazmid 4,6 kb nagyságú és úgy állítjuk elő, hogy a pHMI7 Δ4Δ1 plazmid EcoRI-ClaI fragmensét és a pBR322 plazmid EcoRI-ClaI fragmensét ligáljuk. A pH17 Δ4Δ1 plazmid előállítására a későbbiekben megadottak szerint járunk el (lásd az 5. példát). Mivel a pH17 Δ4Δ1 plazmidban több TaqI restrikciós hely van, a szükséges EcoRI-TaqI fragmenst úgy állítjuk elő, hogy szubklónozzuk a pH17 Δ4Δ1 EcoRI-HpaI és HpaI-TaqI fragmenseket. A pNM608 plazmid tartalmazza az E. coli triptofán transzkripció aktivációs szekvenciát, és így felhasználható a jelen leírás szerinti eljárásban.

A témában jártas szakember felismeri, hogy a fentiekben ismertetett különböző dezoxi-ribonukleinsav linkerek jelentős szerepet játszanak az eljárásban. Ezeket a szekvenciákat ismert módon szintetizáljuk a módosított foszfo-triéster-módszerrel, amelyben teljesen védett didezoxi-ribonukleotid építőköveket használunk. Ezek a szintetikus módszerek jól ismertek, és lényegében az alábbiak szerint végezzük: Itakura és munkatársai, Science, 198, 1056 (1977); Crea és munkatársai, PNAS, USA, 75, 5765 (1978). Különösen előnyös módszert közölnek az alábbi szerzők: Hsiung és munkatársai, Nucleic Acid Research, 11, 3227 (1983), és Narang és munkatársai, Methods in Enzymology, 68, 90 (1980).

A használt linkerek kódolnak egy transzlációs aktivációs szekvenciát és aminosavakat, amelyek között szerepel a fentiekben ismertetett bGH-származék első része (N-terminális régió). A bGH-t kódoló szekvencia további részét (ebben szerepel a megfelelően elhelyezett transzlációs stop jel), és a transzkripció aktivációs szekvenciát úgy építjük be, hogy a pCZ101 plazmid megfelelő fragmensét ligáljuk. Ezeknek a ligálásoknak a során a találmány szerinti szarvasmarha növekedési hormon-származékot kifejező plazmidokat kapunk.

A pCZ101 plazmid 900 bázispárból álló BstEII restrikciós fragmensének kihalászása, majd az ezt követő recirkularizáció után megkapjuk a pCZ103 jelű plazmidot. A BstEII delécio nem érinti a pCZ101 plazmid bGH-t kódoló régióját. Ha a fenti eljárás során a pCZ101 plazmid helyett a pCZ103 plazmidot használjuk, úgy egy hasonló, de 900 bázispárral kisebb plazmidhoz jutunk. A pCZ103 plazmidból származó vektorok által kifejezett bGH-származékok így azonosak a pCZ101 plazmidból származó származékokkal.

Ha a fentiekben ismertetett eljárásban a pJR1 és pAT2 előállításánál a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-XbaI és 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI restrikciós fragmensei helyett a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-XbaI és a 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI restrikciós fragmenseit használjuk, úgy sorrendben a pJR1.3 és pAT2.3 származék plazmidokat kapjuk. Ha a pCZ101 plazmid 10,2 nagyságú BamHI-EcoRI és 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI restrikciós fragmensei helyett a pAT1, pASP1, pASP2, pCZ154, pCZ155, pCZ156 plazmidok fentiekben ismertetett előállításánál a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI és 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI restrikciós fragmenseit használjuk, úgy sorrendben az alábbi plazmidokhoz jutunk: pAT1.3, pASP2.3, pCZ154.3, pCZ155.3, továbbá pCZ156.3.

A találmány szerinti eljárás semmilyen módon nem limitált egy adott transzkripció aktivációs szekvencia használatára, mivel egy specifikus szekvencia kiválasztása nem lényeges a találmány szempontjából. Az előzőekben példaként említett lipoprotein és triptofán aktivációs szekvencián kívül például, nem limitálón, az alábbi transzkripció aktivációs szekvenciákat használhatjuk: E. coli laktóz (lac), a lambda PL_{OL} és a PR_{OR} bakteriofágok transzkripció aktivációs szekvenciája. Ezenkívül egy vagy több transzkripció aktivációs szekvenciát is használhatunk, vagy ezeknek egy részét, egymás mellett, például a trp és lac vagy a tac transzkripció aktivációs szekvenciákat.

Az összes ilyen szekvencia jellemzett, és szintetikusan előállítható vagy ismert plazmidokból izolálható.

A plazmid replikációt egy példaként említett kivitelezési változatban egy hőindukálható runaway replikon határozza meg [1 557 774 számú birt szabadalmi leírás és Uhlin és munkatársai, Gene, 6, 91 (1979)]. 30 °C alatti hőmérsékleten, előnyösen 25 °C hőmérsékleten a replikon alacsony kópiaszámot biztosít, sejtenként 10–15-öt. Ha a hőmérsékletet 37 °C-ra növeljük, úgy a másolatok számát szabályozó rendszer nem működik, és a replikont tartalmazó plazmidok száma sejtenként 1000–2000-re nő. Az itt példaként említett runaway (elveszthető) replikont az előzőekben ismertetett pIM-I'-A3 kiindulási plazmid tartalmazza. A témában jártas szakember érti, hogy a jelen leírás nem korlátozódik egy adott ilyen típusú replikon vagy másolat mutáns használatára. Más indukálható „elveszthető” vagy nagyszámú másolatot biztosító replikonok állíthatók elő megfelelő szelekcióval, vagy WO82/02901 közzétételi irat szerint eljárva.

Ezeket a replikonokat felhasználhatjuk olyan expressziós vektorok előállítására, amelyek a jelen találmány oltalmi köréhez tartoznak.

Ilyen „elveszthető” replikonokat hordozó vektorokba idegen géneket klónozza olyan termékekhez jutunk, amely indukciókor elveszti a másolatok számát szabályozó rendszert, és nagymértékben fokozódik az adott protein szintézise, így ez idáig ismeretlen és fel nem fedezett intracelluláris proteinszemcsék jönnek létre. Ezek a szemcsék, amelyek egyébként a találmány szerinti eljárást jellemzik, igen homogének protein-összetételük szempontjából, és így megkülönböztethetők az ismert, nagymolekulasúlyú aggregátumoktól, amelyek időnként előfordulnak a recombináns dezoxi-ribonukleinsavat hordozó gazdasejtekben. Ezek a sejtekben jelenlevő aggregátumok heterogének, és gyakran sejtet felépítő komponenseket, például nukleinsavakat, szénhidrátokat, lipideket és peptideket tartalmaznak, az adott protein terméket mindössze 10–20%-ban tartalmazza. A találmány szerinti granulátumok igen homogének, az előállítani szándékozott protein termékek legalább 50, gyakran 80%-ot meghaladó mennyiségben tartalmazza.

A találmány révén előállítható szemcsés termék könnyen izolálható a sejt lizátumából, és stabil, ha kiskonzentrációjú karbamidos vagy detergenst tartalmazó oldattal mossuk. Mosáskor eltávolíthatók a szemcséhez nem specifikusan kötődő proteinek. Izoláláskor igen specifikus aktív anyagot kapunk, ekkor lényegesen tisztul az idegen protein. Az összes további tisztítási lépés így egyszerű.

Különösen előnyös az a tény, hogy a granulátumokból a sejtfal komponensei könnyen elkülöníthetők.

Úgy gondoljuk, hogy a találmány szerinti szemcsés anyag képződésekor az idegen protein nem zavarja a sejt normális metabolizmusát, és nem következik be a még nem érett sejt halála. Egyes proteinek, például a humán proinzulin *E. coli* sejtekben gyorsan degradálódik, és nem halmozódik fel. Azonban, ha ilyen proteinek a találmány szerinti, „elveszthető” replikont tartalmazó vektorokkal fejezzük ki, úgy a proinzulin fehérje oldhatatlan granulátumot képez, és ebben az alakban nem következik be az egyébként labilis protein proteolitikus degradációja. A találmány szerinti granulátumok így nem csupán labilis proteinek

felhalmozására alkalmasak, de egyszerűbbé teszik az izolálást és a tisztítást a különböző gének által meghatározott termékek esetén.

Ahogy azt az előzőekben megadtuk, bármely aktiválható vagy indukálható replikon és transzkripció és translációs aktivációs szekvencia, továbbá gyakorlatilag bármely, funkcionált polipeptidet meghatározó nukleotid szekvencia vagy fuzionált génterméket leíró gén felhasználható a fentiekben meghatározott módszer szerint használt vektorok előállítására.

Ilyen kódoló szekvencia például, nem limitálón, a szarvasmarha növekedési hormont (bGH), a humán növekedési hormont (hGH), a humán pre-növekedési hormont (pre-hGH), a sertés növekedési hormont (pGH), emlős növekedési hormont, madár növekedési hormont, növekedési hormon releasing faktort, a humán inzulin A-láncát, a humán inzulin B-láncát, a humán proinzulint, a humán pre-proinzulint, humán és nem humán interferont, urokinázt, szöveti plazminogén aktivátort, interleukin II-t vagy bármely polipeptid hormont, polipeptid enzimet és bármely kutatási vagy gyakorlati értékkel rendelkező, biológiaiilag aktív polipeptidet kódoló szekvencia.

A fenti módon tenyésztett transzformált sejtek, amelyek a granulátumot halmozzák fel például, nem limitálón, a következők lehetnek: *E. coli* K12 RV308/pCZ1920, *E. coli* K12 RV308/pJR1, *E. coli* K12 RV308/pASP1, *E. coli* K12 RV308/pCZ112, *E. coli* K12 RV308/pASP2, *E. coli* K12 RV308/pAT1, *E. coli* K12 RV308/pAT2, *E. coli* K12 RV308/pCZ154, *E. coli* K12 RV308/pCZ156, *E. coli* K12 RV308/pJR1.3, *E. coli* K12 RV308/pASP1.3, *E. coli* K12 RV308/pASP2.3, *E. coli* K12 RV308/pAT1.3, *E. coli* K12 RV308/pAT2.3, *E. coli* K12 RV308/pCZ154.3 és *E. coli* K12 RV308/pCZ156.3.

A találmány szerinti, szemléltető jelleggel bemutatott dezoxi-ribonukleinsav szekvenciák és plazmidok számtalan módosítása képzelhető el. Így például a genetikai kód degeneráltsága miatt lehetséges a polipeptidet meghatározó régiók nukleotidjainak, továbbá például a TAG vagy TGA translációs stop jeleknek a helyettesítése,

||| |||

ACT ACT

ez utóbbiak esetén például TAA translációs stop jelre.

|||

ATT

A fentiekben R betűvel jelzett rész bármely olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia lehet, amely a (9) leucin-191 (fenil-alanin) aminosavakat határozza meg a bGH molekulában. Ezeket a szekvenciákat az ismert bGH aminosav szekvenciából meghatározhatjuk, és ezután ismert szintetikus módszerekkel előállíthatjuk. Ugyanakkor ügyelnünk kell arra, hogy a nukleotid tripleteket úgy válasszuk meg, hogy azok megfeleljenek az ismert alapkövetelményeknek és extrapolálásoknak, amelyeket Zuker és Stiegler adott meg [Nucleic Acids Research, 9(1), 133 (1981)], tudniillik, hogy elkerüljük a hírvivő ribonukleinsavban komplementer bázisok képződését. Ilyen komplementer bázisok között létrejövő hidrogénhid-kötések ugyanis nyeleket és hurkokat hoznak létre, és csökkentik a transláció hatékonyságát. A témában jártas szakember érti, hogy szintetikus módszerekkel (lásd előbb) a

fentiekben ismertetett módosított és variált szekvenciák előállíthatók. Ezért a találmány nem csupán a példaként, jelen leírásban megadott dezoxi-ribonukleinsav szekvenciára és plazmidokra vonatkozik.

A találmány szerinti expressziós vektorokat és módszert több gazda mikroorganizmusban használhatjuk, például az alábbi gram-negatív festődésű prokariota mikroorganizmusokban, például *Escherichia coli*, *E. coli* K12, *E. coli* K12 RV308, *E. coli* K12 NB101, *E. coli* K12 C600, *E. coli* K12 C600 R_K-M_K-, *E. coli* K12 RR1, *E. coli* K12 MM294 és mások. Bár a találmány szerinti eljárás összes kivitelezési változata felhasználható, egyes vektorok és transzformánsok előnyösek. Előnyös vetektorok például a következők: pCZ1920, pJR1.3, pCZ112, pAT1, pAT1.3, pAT2, pAT2.3, pASP1, pASP1.3, pCZ154, pCZ154.3, pCZ156, pCZ156.3, pASP2.3 és pASP2, melyek a következő hormonokat kódolják:

plazmid	hormon-származék
pCZ1920	Met-Lys-Gly-Asn-Ser-Met-Ala-bGH
pJR1	Met-bGH(Ala az 5-helyzetben)
pJR1.3	Met-bGH(Ala az 5-helyzetben)
pCZ112	Met-Asp-Asp-Lys-bGH
pAT1	Met-bGH
pAT1.3	Met-bGH
pAT2	Met-bGH
pAT2.3	Met-bGH
pASP1	Met-Asp-bGH
pASP1.3	Met-Asp-bGH
pCZ154	Met-Val-bGH
pCZ154.3	Met-Val-bGH
pCZ156	Met-Asp-bGH
pCZ156.3	Met-Asp-bGH
pASP2.3	Met-Asp-bGH
pASP2	Met-Asp-bGH

Előnyös transzformánsok például az alábbi mikroorganizmusok: *E. coli* K12 RV308/pCZ1920, *E. coli* K12 RV308/pJR1, *E. coli* K12 RV308/pJR1.3, *E. coli* K12 RV308/pCZ112, *E. coli* K12 RV308/pAT1, *E. coli* K12 RV308/pAT1.3, *E. coli* K12 RV308/pAT2, *E. coli* K12 EV308/pAT2.3, *E. coli* K12 RV308/pASP1, *E. coli* K12 RV308/pASP1.3, *E. coli* K12 RV308/pCZ154, *E. coli* K12 RV308/pCZ154.3, *E. coli* K12 RV308/pCZ156, *E. coli* K12 RV308/pCZ156.3, *E. coli* K12 RV308/pASP2.3 és *E. coli* K12 RV308/pASP2.

Az előnyös csoporton belül az alábbi plazmidok és transzformánsok különösen előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek: pCZ112, pCZ154, pCZ154.3, pCZ156, pCZ156.3, pASP2.3 és pASP2, illetve *E. coli* K12 RV308/pCZ112, *E. coli* K12 RV308/pCZ154, *E. coli* K12 RV308/pCZ154.3, *E. coli* K12 RV308/pCZ156, *E. coli* K12 RV308/pCZ156.3, *E. coli* K12 RV308/pASP2.3 és *E. coli* K12 RV308/pASP2.

A témában jártas szakemberek tudják, hogy a találmány szerinti expressziós vektorokat megfelelő gazda-mikroorganizmusok transzformálására használjuk úgy, hogy egy szarvasmarha növekedési hormonszármazék ismert fermentációs körülmények között kifejeződik. A termék rendkívül homogén granulátum alakjában fejeződik ki, és a sejt lizátumból ismert

módszerekkel izolálható, a termék pedig felhasználható a tejtermelés fokozására és a szarvasmarha növekedésének általános stimulálására. A felhasználás módjai, a szarvasmarhának adagolandó dózisok ismertek, és a 0085036 számú európai közzétételi iratban olvashatók (7–9. oldal).

A továbbiakban példákkal szemléltetjük a találmányt.

1. példa

A pNM789B előállítása

A. A pKENO21 plazmid és ennek XbaI-BamHI fragmensének előállítása

Kiindulási anyagként a pKENO21 plazmid (lásd a 3. ábrán: 106) 5,1 kb nagyságú XbaI-BamHI restrikciós fragmensét használjuk. A pKENO21 plazmid a pKEN111 származéka [lásd az 1. ábrán: 101, továbbá Lee és munkatársai, *J. Bact.*, 146, 861–866 (1981) és Zwiebel és munkatársai, *J. Bact.*, 145, 654–656 (1981)], amely plazmid az *E. coli* CC620 törzsből izolálható (letéti szám: NRRL 15011), és amely 2,8 kb nagyságú fragmensén hordozza a *E. coli* lipoprotein génjét. A fragmens leírását Nakamura és Inouye adja meg [*Cell*, 18, 1109–1117 (1979)]. A pKENO21 plazmidban az egyetlen EcoRI és Sall restrikciós helyek közötti 650 bázispár nagyságú szekvenciát (pBR322 plazmid) olyan szekvenciával helyettesítették, amely az *E. coli* lipoprotein génjét hordozza. A lipoprotein gén szekvenciája [Nakamura és Inouye (1979)] 462 bázispárból álló AluI fragmenst tartalmaz, a lipoprotein gén első tripletjétől (metionin) az 5'-vég felé haladva, és ez tartalmazza a promotert, az 5'-nem transzlátált szakaszt és a riboszóma kötőhelyet. A transzlációs iniciációs metionin szignál előtt 16 bázispárral helyezkedik el a riboszóma kötőhelyen belül az egyetlen XbaI restrikciós hely. Egyetlen PvuII restrikciós helyet találunk a struktúrgén transzlációs terminációs kódonjától 105 bázispárral balra, ezt BamHI restrikciós helyévé változtatjuk úgy, hogy egy alábbi nukleotid sorrendű, szintetikus dezoxi-ribonukleinsav linkert kapcsolunk hozzá: 5'-CCGGATCCGG-3'. (A linkert az alábbi helyről vásároltuk: Collaborative Research). A BamHI helyet a lipoprotein utolsó 35 aminosavának kódoló szekvenciája, a transzlációs terminációs jel és a hírvívő ribonukleinsav 3'-nem transzlátált régiójának megfelelő szekvencia követi. A pKENO21 plazmid tartalmaz továbbá 850 bázispárból álló, a lipoprotein génnel nem összefüggő szekvenciát, ez az *E. coli* kromoszómában ettől jobbra helyezkedik el. Ezek a szekvenciák azért vannak jelen, mivel a gén eredeti izolálásakor a módszerek és a rendelkezésre álló restrikciós helyek ezt eredményezték.

Az 1., 2. és 3. ábrán megadott sémából kiderül, hogy a pKENO21 plazmid a pKEN111 plazmidból származik. Az előállítást az alábbiak szerint végezzük: 50 µg pKEN111 (lásd az 1. ábra: 101) dezoxi-ribonukleinsavat 25 egység HpaII restrikciós enzimmel kezelünk 300 µl alábbi összetételű pufferban: 20 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4, 10 mmól magnézium-diklorid és 6 mmól β-merkaptó-etanol. A reakciót 2 óráig 37 °C hőmérsékleten. Kétszer 300 µl alábbi összetételű eleggyel extrahálunk: fenol-kloroform 50:50.

A vizes fázist elkülönítjük és 2,5 térfogat etanollal és 0,1 térfogat 3 mólos nátrium-acetát-oldattal ki-

csapjuk. A kivált dezoxi-ribonukleinsavat 100 µl elektroforetikus pufferban oldjuk és 5% poliakril-amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk (az összes gélben 29:1 arányú akril-amid:bisz arányt választunk, kivéve, ha másként nem jelezzük). A gél 0,5 µg/ml etídium-bromiddal festjük, és a csíkokat hosszú hullámhosszú ultraibolya fényben vizsgáljuk. A gélről elektroelúcióval egy 950 bázispárból álló csíkot izolálunk dialitikus zsákba. A dezoxi-ribonukleinsavat fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapjuk, majd a 2,5 µg-nyi terméket 25 µl TEN-oldatban oldjuk. Ennek összetétele a következő:

10 mmól nátrium-klorid
10 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4 és
1 mmól nátrium-etilén-dinitrilo-tetraecetsav, (EDTA), pH=8,0.

2 µg mennyiségű, 950 bázispárból álló HpaII fragmenst AluI restrikciós enzimmel kezelünk 200 µl alábbi összetételű pufferban:

50 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidro-klorid (pH=7,6),
6 mmól magnézium-diklorid és
6 mmól β-merkaptó-etanol.

A reakciót 2 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük. Ezután 6% poliakril amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk a dezoxi- ribonukleinsavat, és a keletkezett 462 bázispárból álló AluI fragmenst az előzőekben megadottak szerint különítjük el és tisztítjuk. 1 µg 462 bázispárból álló AluI fragmenst 10 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldunk, ennek összetétele a következő:

66 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,6,
10 mmól magnézium-diklorid,
10 mmól ditio-treitol,
0,4 mmól adenzin-trifoszfát.

Az elegy 150 pmól foszforilezett EcoRI linkert is tartalmaz (5'-GGAATTCC-3'; Collaborative Research), továbbá 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt. 16 órán át 4 °C-on inkubáljuk a reakcióelegyet, majd 65 °C-on tartjuk 10 percen át, és ezután 100 µl-re hígítjuk, az alábbi összetételű EcoRI pufferral:

100 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,2,
50 mmól nátrium-klorid,
10 mmól magnézium-diklorid,
6 mmól β-merkaptó-etanol.

40 egység EcoRI enzimet adunk az elegyhez, majd 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubálunk. Fenol és kloroform elgyével extraháljuk a mintát, és etanollal kicsapjuk. A kivált dezoxi- ribonukleinsavat 20 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldjuk, a puffer 0,1 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt és 0,1 µl pBR322 (1. ábra: 102) dezoxi- ribonukleinsavat tartalmaz, amit EcoRI enzimmel lineárizáltunk, és ezután alkalikus foszfáttal kezeltünk. 4 °C hőmérsékleten 16 órán át ligálunk, majd a kapott dezoxi- ribonukleinsavval ismert módon E. coli K12 HB101 törzset transzformálunk. A transzformánsokat 12 µg/ml tetraciklint tartalmazó agar lemezekon szelektáljuk, és a plazmidokat a rezisztens

telepekből gyors alkalikus extrakcióval izoláljuk [Birnbom és Doly, Nucleic Acids Research, 7, 1513-1523 (1979)]. Így 466 bázispárból álló XbaI-BamHI fragmenst tartalmazó plazmidot (1. ábra: 103) kapunk, és ezt használjuk a következő lépésben kiindulási anyagként.

2 µg plazmid (2. ábra: 103) dezoxi-ribonukleinsavat 2 egység HindIII enzimmel kezelünk 50 µl alábbi összetételű reakcióelegyben:

60 mmól nátrium-klorid,
10 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4,
10 mmól magnézium-diklorid és
6 mmól β-merkaptó-etanol.

A reakciót 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük. Fenol és kloroform elegyével extraháljuk az elegyet, majd a dezoxi- ribonukleinsavat etanollal kicsapjuk, 200 µl alábbi összetételű pufferban oldjuk ezután:

300 mmól nátrium-klorid,
30 mmól nátrium-acetát, pH=4,25,
1 mmól cink-diklorid és
200 egység S1 nukleáz (Miles Laboratories).

1 órán át 15 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd a reakció leállítására fenol és kloroform elegyével extrahálunk és etanollal kicsapjuk a terméket. A kapott dezoxi-ribonukleinsavat 10 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldjuk, a pufferhez előzőleg 20 pikomól foszforilezett BamHI linkert (5'-CCGGATCCGG-3'; Collaborative Research) és 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt adunk. 4 °C hőmérsékleten 16 órán át inkubáljuk az elegyet, majd 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk a ligáz inaktíválására, ezt követően pedig az alábbi összetételű BamHI pufferral 100 µl-re egészítjük ki:

150 mmól nátrium-klorid,
20 mmól trisz-hidro-klorid, pH=8,0,
10 mmól magnézium-diklorid, és
6 mmól β-merkaptó-etanol.

Ez az elegy 20 egység BamHI enzimet is tartalmaz. 2 órán át 37 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd 1% agarózt tartalmazó gélen tisztítjuk. A gél festjük, és a 4,5 kb nagyságú nagyobb fragmenst eluálással elkülönítjük, miután fagyasztottuk. Ezután fenol és kloroform elegyével extrahálva és etanollal kicsapva tisztítjuk. A kohézív BamHI végekkel rendelkező tisztított fragmenst 20 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldjuk, ami 0,1 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt tartalmaz. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten ligálunk, majd a kapott dezoxi-ribonukleinsavval E. coli HB101 sejteket transzformálunk. A transzformánsokat ampicillin (Ap^r) rezisztencia alapján szelektáljuk, 100 µg/ml ampicillin jelenlétében. A telepeket 10 µg/ml tetraciklinnel szembeni érzékenységre vizsgáljuk (Ts^s). Több Ap^rTc^s genotípusú és az előzőekben megadott Birnbom módszerrel izolált plazmidot vizsgálunk a HindIII hely hiányára, és az egyetlen BamHI hely jelenlétére. EcoRI és SalI restrikciós endonukleázokkal, egymást követő emésztés után 466 és 305 bázispárból álló fragmen-

seket kapunk. Egy ilyen plazmidot (2. ábra: 104) szelektálunk, és ezután az lpp promotortól balra eső EcoRI helyet HindIII helyé alakítjuk át.

2 µg plazmid (2. ábra: 104) dezoxi-ribonukleinsavat 100 µl EcoRI pufferban 0,2 egység EcoRI restrikciós endonukleázzal kezelünk 10 percen át 37 °C hőmérsékleten. A reakció leállítására 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk az oldatot, majd fenol és kloroform elegyével extrahálunk, és a dezoxi-ribonukleinsavat etanollal kicsapjuk. A terméket 200 µl S1 nukleáz pufferban oldjuk, ez 1000 egység/ml S1 nukleázt tartalmaz. A reakciót 1 órán át végezzük 12 °C hőmérsékleten. A reakció leállítását fenol és kloroform elegyével kivitelezett extrakcióval végezzük, a terméket etanollal csapjuk ki. A kapott dezoxi-ribonukleinsavat 10 µl, 20 pikomól foszforilezett HindIII linkert (5'-CCAAGCTTGG-3'; Collaborative Research) és 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban szuszpendáljuk. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, majd 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk, és 150 µl, 10 egység HindIII enzimet tartalmazó HindIII pufferral hígítjuk 150 µl végtérfigatig. Az elegyet 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd ezután 1% agarózt tartalmazó gélen frakcionáljuk. A legnagyobb csíkot (az egyetlen vágást szenvedett plazmiddal egyenértékű) ismert módon elkülönítjük és tisztítjuk, majd 20 µl, 0,2 egység T4 ligázt tartalmazó, T4 ligáz pufferban oldjuk. A reakcióelegyet 4 °C hőmérsékleten 16 órán át inkubáljuk, majd E. coli HB101 sejteket transzformálunk. A transzformánsokat ampicillin rezisztenciára szelektáljuk, és az ismert módon izolált plazmidokat restrikciós enzim analízisnek vetjük alá. Szelektáljuk az EcoRI-HindIII fragmenst tartalmazó plazmidot (2. ábra: 105) és felhasználjuk klónozó vektorként az lpp gén 3'- régiójának klónozására.

2 µg plazmid (3. ábra: 105) dezoxi-ribonukleinsavat 50 µl SalI restrikciós pufferban 2 egység SalI enzimmal kezelünk. A puffer összetétele a következő: 150 mmól nátrium-klorid, 6 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,9, 6 mmól magnézium-diklorid, 6 mmól β-merkaptó-etanol. A reakciót 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük, majd 2 egység BamHI enzimet tartalmazó BamHI pufferral 150 µl végtérfigatra hígítjuk. 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet, majd 2,5 egység alkalikus foszfátot adagolunk, és 1 órán át 65 °C hőmérsékleten folytatjuk az inkubálást. A terméket fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapjuk, TEN (lásd előbb) elegyben oldjuk, és felhasználjuk az lpp gén 3'-fragmensének klónozására.

Az lpp gén 3'-regióját tartalmazó fragmens előállítására 10 µg pKEN111 (3. ábra: 101) dezoxi-ribonukleinsavat 200 µl, 10 egység HpaI enzimet tartalmazó alábbi összetételű HpaI pufferban oldunk:

20 mmól kálium-klorid,
10 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4,
10 mmól magnézium-diklorid és
6 mmól β-merkaptó-etanol.

A reakciót 2 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük. A dezoxi-ribonukleinsavat fenol és kloroform elegyével extraháljuk és etanollal kicsapjuk, a kicsapott

terméket 10 µl, 20 pikomól foszforilezett SalI linkert tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldjuk, az oldathoz 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsavat adunk. A linkert az alábbi nukleotid sorrendű: 5'-GGTCCGACC-3', beszerezhető: Collaborative Research. A reakciót 16 órán át 4 °C hőmérsékleten végezzük. A ligáz inaktiválására 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet.

A kapott elegyet 10 egység SalI enzimet tartalmazó SalI pufferral 100 µl-re hígítjuk, és 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután 300 µl térfogatúra hígítjuk 10 egység PvuII restrikciós enzimet tartalmazó, alábbi összetételű PvuII pufferral:

60 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,5,
6 mmól magnézium-diklorid,
6 mmól β-merkaptó-etanol.

1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, majd a dezoxi-ribonukleinsavat 5% poli-akril-amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk.

0,5 µg 950 bázispárból álló fragmenst különítünk el, tisztítunk és oldunk TEN-elegyben.

0,2 µg fragmenst 20 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldunk, amely 20 pikomól foszforilezett BamHI linkert (5'-CCGGATCCGG-3'; Collaborative Research), és 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt tartalmaz. Az elegyet 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A kapott dezoxi-ribonukleinsavat 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk, majd ezután 100 µl BamHI pufferral hígítjuk, a puffer 20 egység BamHI enzimet tartalmaz. 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, és ezután 5% poliakril-amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk a főlös linker molekulák eltávolítására. A kapott 950 bázispárból álló fragmens BamHI és SalI kohézív végeket tartalmaz, ismert módon tisztítjuk, 20 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban oldjuk, amely 0,2 µg klónozóvektort (lásd előbb) és 0,2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt tartalmaz. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, majd a dezoxi-ribonukleinsavval E. coli K12 HB101 sejteket transzformálunk.

Az ampicillinre rezisztens transzformánsokból plazmidot izolálunk, és a SalI-BamHI fragmens jelenlétének vizsgálatára ismert módon analizáljuk. Az előállítandó 5,2 kb nagyságú fragmenst pKENO21 jellel jelöljük (3. ábra: 106).

10 µg pKENO21 plazmidot 37 °C hőmérsékleten 200 µl alábbi összetételű XbaI/BamHI pufferban emésztünk: 150 mmól nátrium-klorid, 10 mmól trisz-hidro-klorid, pH=8,0, 10 mmól magnézium-klorid, 6 mmól β-merkaptó-etanol. Az emésztést 10 egység BamHI enzimmal végezzük 1 órán át. Ezután 10 egység XbaI enzimmal folytatjuk az emésztést 37 °C hőmérsékleten. A kapott XbaI-BamHI emésztett dezoxi-ribonukleinsavat 2,5 egység alkalikus foszfáttal kezeljük 1,5 órán át 65 °C hőmérsékleten, majd fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapva összegyűjtjük, és további felhasználáshoz 50 µl TEN-pufferban oldjuk (3. ábra: 107).

B. A pNM575 plazmid előállítása

A humán növekedési hormon génjének kódoló szekvencia részét tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav

fragmens forrásaként a ptpED50chGH800 plazmidot (4. ábra: 108) használjuk [Martial és munkatársai, Science, 205, 602-607 (1979)]. Ezt a fragmenst szintetikusán is előállíthatjuk [Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978)], vagy ismert módon izolálhatjuk [Goodman és munkatársai, Methods in Enzymology, 68, 75-90 (1979)]. Ebben az esetben humán növekedési hormont meghatározó hirtív ribonukleinsavat izolálunk humán agyalapi mirigyből. A humán növekedési hormon génjének egy részét hordozó ptpED50chGH800 plazmid egyetlen SmaI restrikciós helyet tartalmaz a gén translációs terminációs kodonjától jobbra 6 bázispárral. Ezt a helyet BamHI helyre változtattuk, az alábbiak szerint eljárva:

6 µg plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 6 egység SmaI enzimmel emésztünk 200 µl alábbi összetételű SmaI restrikciós pufferban:

- 15 mmól trisz-hidro-klorid, pH=8,0,
- 6 mmól magnézium-diklorid,
- 15 mmól kálium-klorid és
- 6 mmól β-merkaptó-etanol.

1,5 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet. Miután az emésztés teljes, fenol és kloroform elegyével extrahálunk, és a dezoxi-ribonukleinsavat etanolos kicsapással különítjük el. A csapadékot 24 µl TEN-elegyen oldjuk. 40 pM foszforilezett BamHI adapter fragmenst (Collaborative Research) adunk 0,5 µg (0,2 pikomól végekre számítva) fenti módon emésztett plazmidhoz 16 µl, 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz tartalmazó ligáz pufferban. 2 órán át 22 °C hőmérsékleten, majd 16 órán át 4 °C hőmérsékleten és 10 percen át 65 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet. BamHI restrikciós enzimmel ismert módon BamHI kohézív végeket állítunk elő. Az enzim hasítja a linker szekvenciát és a klónozott humán növekedési hormon cDNS szekvencia kezdeténél levő BamHI helyet. Így BamHI végekkel rendelkező, 691 bázispárból álló fragmenshez jutunk, ezt 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen ismert módon szeparáljuk és kinyerjük. Az elkülönített dezoxi-ribonukleinsav fragmenst ligáljuk 0,2 µg BamHI restrikciós endonukleázzal emésztett és alkalikus foszfátazzal kezelt pBR322 dezoxi-ribonukleinsavval (4. ábra: 102), a ligálást 20 µl, előzőekben megadott összetételű, 0,2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz tartalmazó pufferban végezzük. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, majd Wensink és munkatársai [Cell., 3, 315-325 (1974)] szerint eljárva E. coli JA221 [NRRL B-15014] sejteket transzformálunk.

A transzformánsokat 100 µg/ml ampicillint tartalmazó agar lemezekben szelektáljuk, és a bennük levő plazmidot ismert módon izoláljuk, és ezután restrikciós enzimes és gél-elektroforetikus analízissel azonosítjuk. Az előállított pNM575 jelű plazmid (4. ábra: 109) körülbelül 700 bázispárból álló BamHI fragmenst tartalmaz. Ezt ismert módon sokszoroztunk további felhasználásra.

C. A pNM702 plazmid előállítása

Az érett humán növekedési hormon dezoxi-ribonukleinsav szekvenciájában egy FnuDII hely található,

az első nukleotidtól 47 bázispáryi távolságban. 25 µg pNM575 dezoxi-ribonukleinsavat 25 egység BamHI enzimmel emésztünk 250 µl BamHI pufferban 1 órán át 37 °C hőmérsékleten. A BamHI kohézív végekkel rendelkező 691 bázispárból álló fragmenst 6% poliakril-amidot tartalmazó gélről ismert módon izoláljuk és tisztítjuk. A fragmenst tisztítása után a termék 1/3-át (8 µg plazmiddal ekvivalens) 2,5 egység FnuDII enzimmel emésztünk 100 µl alábbi összetételű FnuDII pufferban:

- 6 mmól nátrium-klorid,
- 6 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4,
- 6 mmól magnézium-diklorid,

6 mmól β-merkaptó-etanol. Az emésztést 37 °C hőmérsékleten végezzük 1,5 órán át. Az 538 bázispárból álló dezoxi-ribonukleinsav fragmenst 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézist végezve ismert módon izoláljuk. A fragmens tartalmazza az utolsó, 175 aminosavat meghatározó kódoló szekvenciát, és ezután egy translációs stop jelet.

A foszfo-triéster módszerrel kétszálú dezoxi-ribonukleinsav fragmenst (5. ábra: 110) szintetizálunk az lpp promoter kapcsolásához a humán növekedési hormont meghatározó kódoló régióval. A kétszálú dezoxi-ribonukleinsav fragmens (5. ábra: 110) az alábbi szekvenciájú:

```

30 XbaI
5' CTAGAGGGTATTAATAATGTTCCCATTTGGAT-
   |||||
3' TCCCATTAATTATTAACAAGGGTAACCCCT-

35 -GATGATGATAAGTTCCCAACCA TTCCC T-
   |||||
   -ATACTACTAT T CAAGGGTTGGTAAGGGA-

   -TATCCAGGCTTT TTGACAACGCTATG-
   |||||
40 -ATAGGTCCGAAAACTGTTGCGATAC-

   -CTCCG 3' FnuDII
   |||||
45 -GAGGC 5'.
```

A fragmenst az ismert foszfo-triéster módszert használva állítjuk elő, a fragmenst a következő szegmensekből állítjuk össze:

- 50 1. CTAGAGGGTAT
- 2. TAATAATGTTCC
- 3. CATTGGATGAT
- 4. GATGATAAGTTCC
- 55 5. CAACCATTTCCC
- 6. TTATCCAGGC
- 7. TTTTGGACAACG
- 8. CTATGCTCCG
- 9. CATTATTAATACCCCT
- 60 10. ATGGGAA
- 11. CTTATCATCATCATCCA
- 12. GGTTGGGAA
- 13. GGATAAGGGAAT
- 14. GTCAAAAAGCCT
- 65 15. CGGAGCATAGCGTT.

A fentiek szerint előállított szegmenseket T4 ligázzal katalizált reakcióval egyenként kapcsoljuk egymáshoz az alábbiak szerint:

a) Az 5'-nem foszforilezett 1. szegmenst 5'-foszforilezett 9 szegmens jelenlétében T4 ligázzal hozzákapsoljuk az 5'-foszforilezett 2 szegmenssel, amikor megkapjuk az 1 duplexet [Brown és munkatársai, *Methods in Enzymology*, 68, 109–151 (1979)]. A duplexet preparatív gél-elektroforézissel izoláljuk 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen.

b) Az 5'-foszforilezett 3 szegmenst hozzákapsoljuk az 5'-foszforilezett 4 szegmenshez T4 ligáz segítségével 5'- foszforilezett 11 szegmens jelenlétében, amikor megkapjuk a 2 duplexet, amit 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel végezve tisztítunk.

c) Az 5'-foszforilezett 5 szegmenst 5'-foszforilezett 12 és 13 szegmens jelenlétében T4 ligázzal hozzákapsoljuk az 5'-foszforilezett 6 szegmenshez, amikor megkapjuk a 3 dezoxi- ribonukleinsav duplexet. Ezt 15% poliakril-amidot tartalmazó gél-elektroforézissel tisztítjuk.

d) Az 5'-foszforilezett 7 szegmenst 5'-foszforilezett 14 és 5'- nem foszforilezett 15 szegmens jelenlétében T4 ligázzal hozzákapsoljuk az 5'-foszforilezett 8 szegmenshez, amikor megkapjuk a 4 dezoxi-ribonukleinsav duplexet, amit 15% poliakril- amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk.

e) A 2, 3 és 4 dezoxi-ribonukleinsav duzplexeket T4 ligáz enzimmel összekapsoljuk, és a kapott 5 dezoxi-ribonukleinsav duplexet 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk.

f) Az 5'-foszforilezett 10 szegmenst és az 5 dezoxi-ribonukleinsav duplexet T4 ligázzal hozzákapsoljuk az 1 dezoxi- ribonukleinsav duplexhez. A kapott dezoxi-ribonukleinsav duplexet (5. ábra: 110) 10% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk. Ezt a dezoxi-ribonukleinsav duplexet ezután T4 polinukleotid-kináz enzimmel enzimatikusan foszforilezzük, és a foszforilezést (gamma-P³²)-ATP jelenlétében végezzük.

A pNM702 expressziós plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pKENO21 plazmid (5. ábra: 107) XbaI-BamHI fragmensét (0,1 pM; 0,4 µg) enzimatikusan kapcsoljuk 0,025 pM szintetikus dezoxi-ribonukleinsav fragmenshez (5. ábra: 110) és 0,3 pM (0,08 µg) 538 bázispárból álló fragmensünkhöz (5. ábra: 109) 24 µl reakcióelegyen 1,5 egység T4 dezoxi- ribonukleinsav ligáz jelenlétében. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, majd az előzőekben megadottak szerint *E. coli* JA221 sejteket transzformálunk. A transzformánsokat 100 µg/ml ampicillint tartalmazó agar lemezeken szelektáljuk, majd az adott expressziós plazmid forrásaként tenyésztjük.

A humán növekedési hormon kifejeződését ismert radioimmun- méréssel határozzuk meg [Twomey és munkatársai, *Clin. Chem.*, 20, 389–391 (1974)]. A mérések szerint egy sejtben legalább két millió molekula szintetizálódik.

D. A pNM789 plazmid előállítása

Kiindulási anyagként a pNM702 plazmidot használjuk (6. ábra: 111); ez a humán növekedési hormon expressziós plazmidja. Az előállított plazmid az alábbi aminosavszekvenciát fejezi ki:

Met-Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-bGH.

A szarvasmarha növekedési hormon egy részét meghatározó kódoló szekvenciát hordozó két dezoxi-ribonukleinsav fragmenst a pBR348 plazmidból (6. ábra: 112); [Miller és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 255, 7521–7524 (1980)] izoláljuk. A plazmid a pBR322 plazmid PstI restrikciós helyére klónozva tartalmaz egy 831 bázispárból álló, szarvasmarha növekedési hormont leíró szekvenciát. A Miller és munkatársai (1980) által megadott eljárásn kívül a szarvasmarha növekedési hormont leíró szekvenciát előállíthatjuk szintetikusán [Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978)], vagy előállítható ismert módon Goodman és munkatársai (1979) a szarvasmarha agyalapi mirigyéből izolált hűvivő ribonukleinsavból kiindulva.

A humán és a szarvasmarha növekedési hormont meghatározó kódoló szekvencia igen hasonló, és több homológiát mutat. A szarvasmarha növekedési hormont kifejező plazmid előállításakor különösen előnyösen használható a PvuII restrikciós enzimmel kapott fragmens.

A keletkező fragmensek 497 bázispár nagyságúak humán növekedési hormon és 494 bázispár hosszúak a szarvasmarha növekedési hormon esetén, a megfelelő restrikciós helyek hasonló leolvasási fázisban vannak mindkét frekvencia esetén.

10 µg pNM702 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat (6. ábra: 111) 1 egység PvuII restrikciós enzimmel részlegesen emésztünk 200 µl alábbi összetételű PvuII restrikciós pufferban:

60 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,5,
6 mmól magnézium-diklorid és
6 mmól β-merkaptó-etanol.

A reakciót 37 °C hőmérsékleten végezzük 10 percen át. A reakció leállítására 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd a dezoxi-ribonukleinsavat alkalikus foszfatázzal kezeljük, és a fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen különítjük el. A 497 bázispárból álló PvuII fragmensnek megfelelő lineáris dezoxi- ribonukleinsavat (6. ábra: 113) ismert módon izoláljuk, tisztítjuk és használjuk fel a köztes plazmid (6. ábra: 114) előállítására. A lineáris fragmens valamivel gyorsabban mozdul el a gélen, mint az egyetlen helyen hasított plazmid.

A pBP348 plazmid 494 bázispárból álló PvuII fragmensének előállítására 10 µg plazmidot 10 egység PvuII enzimmel emésztünk 1 órán át 37 °C hőmérsékleten 200 µl PvuII pufferral készült elegyen. A fragmenseket 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen különítjük el, és a 494 bázispárból álló fragmenst (6. ábra: 112) ismert módon azonosítjuk és tisztítjuk.

Köztes plazmidot állítunk elő (6. ábra: 114) úgy, hogy 0,2 µg pNM702 plazmidból származó PvuII fragmenst kapcsolunk 0,05 µg 494 bázispárból álló fragmensünkhöz 20 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz pufferban 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz jelenlétében. A reakciót 16 órán át végezzük 4 °C hőmérsékleten. A transzformánsok előállítására transzformációt és ampicillin jelenlétében szelekciót végzünk, majd a transzformánsokból álló PvuII fragmens jelenlétére és megfelelő orientációjára. A további

kísérletekhez kiválasztjuk a 494 bázispárt tartalmazó PvuII fragmenst, és a 440 bázispárból álló XbaI-SmaI fragmenst tartalmazó plazmidokat.

10 µg köztes plazmidot (7. ábra: 114) 1 egység PvuII enzimmal emésztünk 200 µl PvuII pufferral készült reakcióelegyben 5 percen át 37 °C hőmérsékleten. 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd 1% agaróz gélen elektroforézist végezve elkülönítjük és tisztítjuk az egyetlen PvuII helyet tartalmazó lineáris dezoxi-ribonukleinsavat. Ezt a 3 µg-nyi terméket 5 egység XbaI enzimmal teljesen emésztünk és alkalikus foszfatázzal kezelünk. A fragmenseket 1% agaróz gélen tisztítjuk, és a legnagyobb fragmenszt (az XbaI és az első PvuII hely között humán és szarvasmarha növekedési hormonban levő 109 bázispárt már nem tartalmazza) ismert módon izoláljuk (7. ábra: 115).

A szarvasmarha növekedési hormon első 23 aminosavát (69 bázispár) leíró dezoxi-ribonukleinsav szekvencia az első PvuII restrikciós helyig két HpaII restrikciós helyet tartalmaz, az első a kódoló szekvencia első nukleotidjától 23 bázispáryi távolságra helyezkedik el. 63 bázispárból álló fragmenst (7. ábra: 116) szintetizálunk foszfo-trieszter módszerrel. [Crea és munkatársai: 1978, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:5765]. Ez a fragmens a következő szakaszokat tartalmazza: az lpp riboszóma kötőhelyen levő XbaI helytől számítva 19 bázispáryi szekvencia, az ATG translációs startjel, majd 24 bázispáryi rész, amely meghatározza az alábbi peptidet: Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, tartalmaz továbbá 20 nukleotidot, amely a szarvasmarha növekedési hormont leíró szekvencia egy része (a Phe-től az első HpaII helyig).

A fragmens az alábbi szekvenciájú:

XbaI
5' CTAGAGGGTATTAA TAA TGTTCCCA TTGG-
|||||
3' TCCCA TAAT TATTA CAAGGTAACC-

-ATGA TGATGATAAGTT CCCAGCCAT-
|||||
-TA CTACTACTA TTCAAGGGTCGGTA-

-GTC CTTG TC 3' HpaII
|||||
-CAGGAACAGGC 5'.

A 63 bázispárból álló fragmens előállítására a következő szegmenseket izoláljuk:

1. CTAGAGGGTAT
2. TAATAATGTTCC
3. CATTGGATGAT
4. GATGATAAGTTCC
5. CAGCCATGTCCTTGTC
6. ATGGGAACATTATTAATACCCT
7. TTATCATCATCATCCA
8. ATGGCTGGGAAC
9. CGGACAAGGAC.

A fenti szegmenseket és T4 ligázt használva lépésenként állítjuk elő a 66 bázispárból álló fragmenst, az alábbiak szerint:

a) az 5'-nem foszforilezett 1 szegmenst hozzákapcsoljuk az 5'- foszforilezett 2 szegmenshez 5'-foszforilezett 6 szegmens jelenlétében T4 ligáz enzimmel, amikor megkapjuk az 1 duplexet. Ezt 15% poliakril-amidos gélen elektroforézissel tisztítjuk.

b) Az 5'-foszforilezett 3, 4 és 5 szegmenseket 5'-foszforilezett 7, 8 és 5'-nem foszforilezett 9 szegmens jelenlétében T4 ligázzal kapcsoljuk, amikor megkapjuk a 2 dezoxi-ribonukleinsav duplexet. Ezt 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk.

c) Az 1 és 2 dezoxi-ribonukleinsav duplexeket ezután T4 ligázzal összekapcsoljuk, amikor megkapjuk a 7. ábrán 116 jellel jelzett dezoxi-ribonukleinsav duplexet, amit 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk. Ezt a dezoxi-ribonukleinsav duplexet ezután ismert módon enzimatikusan foszforilezzük T4 polinukleotid kináz enzimmal (gamma- P³²)ATP jelenlétében.

A 46 bázispárból álló dezoxi-ribonukleinsav fragmenst, amely reprezentálja a fentiek során leírt HpaII hely és a PvuII hely közötti szakaszt, előállíthatjuk szintetikusán, de izolálhatjuk az eredeti pBP348 plazmidból is. Így, 100 µg pBP348 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 50 egység PvuII enzimmal emésztünk 400 µl PvuII pufferban 2 órán át 37 °C hőmérsékleten. Fenolos extrakció és etanolos kicsapást követően a kapott dezoxi-ribonukleinsavat 400 µl alábbi összetételű PstI pufferban oldjuk:

50 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4,
6 mmól magnézium-diklorid,
6 mmól β-merkaptó-etanol.

Az elegyhez 50 egység PstI enzimet adunk, és 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubálunk. A dezoxi-ribonukleinsav fragmenseket 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen futtatjuk, és a 46 bázispárból álló szekvenciát tartalmazó 135 bázispárból álló fragmenst ismert módon elkülönítjük és tisztítjuk.

Az elkülönített dezoxi-ribonukleinsav 1/3 részét (megfelel 33 µg-nak) 1 egység HpaII restrikciós enzimmal részlegesen emésztjük, 100 µl alábbi összetételű HpaII pufferban:

20 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,4,
7 mmól magnézium-diklorid,
6 mmól β-merkaptó-etanol.

A reakciót 40 percen át 37 °C hőmérsékleten végezzük. 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd a dezoxi-ribonukleinsav fragmenseket 5% akril-amidot tartalmazó gélen futtatjuk (akril-amid-bisz arány=19:1), futtatáskor megfelelő marker fragmenseket is használunk. A 135 bázispárból álló fragmens HpaII részleges emésztésével kapott 46 bázispárból álló fragmenst (7. ábra: 112) ismert módon tisztítjuk.

0,2 µg plazmid vektor (7. ábra: 115) XbaI-PvuII fragmenst, 3,2 pikomól szintetikusán előállított, 63 bázispárból álló fragmenst (7. ábra: 116) és 0,5 pikomól 46 bázispárból álló fragmenst (7. ábra: 112)

A T₁–T₁₆ oligo dezoxi-ribonukleinsavakat módosított foszfo-triészter-módszerrel állítjuk elő [Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978)]. A különböző oligo dezoxi-ribonukleotidokat az I. táblázatban adjuk meg.

I. táblázat
A timozin α 1 gén szintetikus oligonukleotidjai

Vegyület	Szekvencia	Hosszúság	HPLC analízis, retenciósidő (perc)*
T ₁	A-A-T-T-C-A-T-G-T-C	10	17,4
T ₂	T-G-A-T-G-C-T-G-C-T-G-T-T-G-A	15	24,3
T ₃	T-A-C-T-T-C-T-T-C-T-G-A	12	20,3
T ₄	G-A-T-T-A-C-T-A-C-T-A-A-A	13	22,0
T ₅	G-C-A-G-C-A-T-C-A-G-A-C-A-T-G	15	24,8
T ₆	G-A-A-G-T-A-T-C-A-A-C-A	12	20,1
T ₇	A-G-T-A-A-T-C-T-C-A-G-A-A	13	22,6
T ₈	A-A-G-A-T-C-T-T-T-A-G-T	12	20,2
T ₉	G-A-T-C-T-T-A-A-G-G-A-G	12	20,4
T ₁₀	A-A-G-A-A-G-G-A-A-G-T-T	12	21,1
T ₁₁	G-T-C-G-A-A-G-A-G-G-C-T	12	20,5
T ₁₂	G-A-G-A-A-C-T-A-A-T-A-G	12	20,4
T ₁₃	C-T-T-C-T-T-C-T-C-C-T-T	12	19,9
T ₁₄	T-T-C-G-A-C-A-A-C-T-T-C	12	20,5
T ₁₅	G-T-T-C-T-C-A-G-C-C-T-C	12	20,2
T ₁₆	G-A-T-C-C-T-A-T-T-A	10	17,2

*=szobahőmérsékleten.

A mellékelt 12. ábrán foglaljuk össze a T₁₅ fragmens szintézise kapcsán a szintézis módját. Az ábrán számozzuk a T₁₅ fragmens szintézisekor használt különböző nukleotidokat. A rövidítések az alábbiakat jelentik:

TPSTe: 2,4,6-triizopropil-benzol-szulfonil-tetrazol;
BSA: benzol-szulfonsav;
TLC: vékonyréteg-kromatográfia;
HPLC: nagyfelbontású folyadék-kromatográfia;
DMT: 4,4'-dimetoxi-tritil-csoport;
CE: 2-ciano-etil-csoport;
R: p-klór-fenil-csoport;
Bz: benzoilcsoport;
An: aniszoilcsoport;
iBu: izobutirilcsoport;
Py: piridin;
AcOH: ecetsav, és
Et₃N: trietil-amin.

85 mg (0,05 mmól) teljesen védett 4 tridezoxi-ribonukleotidot és 180 mg (0,1 mmól) 2 vegyületet az 5'-hidroxilcsoporton kezelünk a védőcsoport lehasítására. A reakciót úgy végezzük, hogy 2% benzol-szulfonsavval reagáltatjuk a vegyületeket, kloroform és metanol 7:3 arányú elegyében (10 és 20 ml, sorrendben). A reakciót 10 percen át 0 °C hőmérsékleten végezzük. A reakció leállítására telített, vizes ammónium-bikarbonát-oldatot adunk (2 ml), 25 ml kloroformmal extraháljuk, végül kétszer 10 ml vízzel mossuk az oldatot. A szerves oldószeres fázist magnézium-szulfáttal vízmentesítjük, 5 ml térfogatúra töményítjük, és petroléterrel (35–60 °C-os frakció)

kicsapjuk. A színtelen csapadékot centrifugálással összegyűjtjük, és csökkentett nyomású térben szárítjuk, így magkapjuk a 6 és 8 számú vegyületet. A termék a szilikagél vékonyréteg-kromatográfias vizsgálat (merck 60 F254, kloroform és metanol 9:1 arányú elegye) homogén.

5 Az 1 és 3 jelű trimerek 270 mg-nyi (0,15 mmól), illetve 145 mg-nyi (0,075 mmól) mennyiségeit az 5 és 7 számú foszfo-diészter-származékaikká alakítjuk át úgy, hogy 25 percen át szobahőmérsékleten trietil-amin, piridin és víz 1:3:1 arányú elegyének 10 ml-ében reagáltatjuk. A reagensek eltávolítására rotavaporban desztillálunk, és a desztillációs maradékot háromszor 10 ml vízmentes piridinnel desztillálva szárítjuk. A 8 (0,05 mmól) és 7 trimert 50 mg (0,15 mmól) 2,4,6-triizopropil-benzol-szulfonil-tetrazollal vegyítünk 3 ml vízmentes piridinnel készült reakcióelegyben, majd az elegyet 2 órán át szobahőmérsékleten hagyjuk állni csökkentett nyomású térben. A vékonyréteg-kromatográfias analízis szerint a 8 trimer 95%-a hexamerré alakult (úgy állapítjuk meg, hogy a 4,4'-dimetoxi-tritil-csoportot 10%-os, vizes gélssalvával permetezzük, és 60 °C-on hevítve láthatóvá tesszük). 1 ml vizet adunk a reakcióelegyhez, és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A piridint toluolos kiegészítés után desztillációval távolítjuk el, majd 8 ml 2%-os benzol-szulfonsavval lehasítjuk az 5'-védőcsoportot, ahogy azt a 4 és 2 trimerek előállítására kapcsán megadtuk.

30 A 10 terméket szilikagél oszlopon (Merck 60 H, 3,5x5 cm) tisztítjuk, kloroform és metanol 98:2-95:5 térfogatarányú elegyével végzett gradiens elúcióval. A 10 terméket tartalmazó frakciókat szárazra desztilláljuk.

35 Hasonlóképpen eljárva, az 5 trimert a 6 jelű vegyülethez kapcsoljuk, és a teljesen védett terméket szilikagélen közvetlenül tisztítjuk. Az utóbbi vegyületet a 3'-végen védőcsoport hasítása céljából a fentiek szerint eljárva trietil-amin, piridin és víz elegyében reagáltatjuk, amikor megkapjuk a 9 jelű fragmenst.

40 Végül a 9 és 10 hexamereket 2 ml vízmentes piridinben 75 mg (0,225 mól) 2,4,6-triizopropil-benzol-szulfonil-tetrazol kondenzálószer jelenlétében összekapcsoljuk. A reakció 4 óra alatt zajlik le szobahőmérsékleten, ezután az elegyet rotavaporban desztilláljuk, és a desztillációs maradékot szilikagélen kromatografáljuk. A 160 mg súlyú, 11 számú terméket petroléterrel csapjuk ki. A termék a vékonyréteg-kromatográfias vizsgálat szerint homogén. 20 mg 11 számú vegyületet 0,5 ml piridinben oldunk, és 7 ml

50 tömény ammónium-hidroxiddal kezelünk a védőcsoportok hasítására. A reakciót 60 °C hőmérsékleten végezzük, 8 órán át. Ezután 15 percen át szobahőmérsékleten 80%-os ecetsav-oldatban kezelünk. Az ecetsavat desztillációval eltávolítjuk, és a szilárd halmozállapotú desztillációs maradékot 4 ml 4%-os, vizes ammónium-hidroxid-oldatban oldjuk, és az oldatot háromszor 2 ml etil-éterrel extraháljuk. A vizes fázist 1–2 ml térfogatúra töményítjük, és egy részét

60 a 12 vegyület tisztítására nagynyomású folyadék-kromatográfiának vetjük alá. A legnagyobb csúcsnak megfelelő frakciókat összegyűjtjük (2A₂₅₄ egység), és 5 ml térfogatúra töményítjük. A végső 12 terméket BiO-gélen P-2) kisózzuk (1,5x100 cm méretű oszlop). Az eluálást 20%-os, vizes etanollal végezzük. Az

oldatot szárazra desztilláljuk, és 200 µl vízben szuszpendáljuk, amikor oldatot kapunk (A254:10). A 12 vegyület szekvenciáját kétdimenziós szekvencia-analízissel bizonyítjuk.

A teljes timozin α 1 gént 16 szintetikus oligo-nukleotidból állítjuk össze, a szomatosztatin előállítására kapcsán megadottak szerint eljárva [Itakura és munkatársai (1977)], vagy az inzulin [Goeddel és munkatársai (1979)], vagy a növekedési hormon [Goeddel és munkatársai (1979), Nature, 281, 544] kapcsán leírtak szerint eljárva.

10–10 µg mennyiségű T₂–T₁₅ oligo-nukleotidot [gamma-P³²]-adenozin-trifoszfáttal [New England Nuclear] kvantitatíven foszforilezünk T4 polinukleotid-kináz jelenlétében [Goeddel és munkatársai (1979)]. A kapott specifikus aktivitás 1 Ci/mmól. A radioaktívan jelzett fragmenseket 20% poliakrilamid/7 mól karbamid gélen elektroforézissel tisztítjuk, és az eluált fragmensek szekvenciáját kétdimenziós elektroforetikus homokromatográfiával bizonyítjuk [Jay és munkatársai, Nucleic Acids Res., 1, 331 (1974)].

Az analitikai méréseket kigyóméreggel részlegesen emésztett termékkel végezzük. A T₁ és T₁₆ fragmenseket nem foszforilezett alakban használjuk a nemkívánatos polimerizáció csökkentésére, ami a következő ligációs reakció során következhet be. 2–2 µg oligo-nukleotidot négy fragmenst tartalmazó négy csoportba kapcsolunk össze (lásd a mellékelt 13. ábrát), a kapcsolást ismert módon T4 dezoxi-ribonukleinsavligázal végezzük [Goeddel és munkatársai (1979)].

A reakcióterméket 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen 7 mól karbamid jelenlétében elektroforézissel tisztítjuk [Maxam és Gilbert, PNAS., USA, 71, 3455 (1977)]. A négy izolált terméket ligáljuk, és a reakcióelegyet 10% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel választjuk szét. A timozin α 1 gén nagyságának megfelelő helyen levő dezoxi-ribonukleinsavat (90–105 bázispár) elektroelúcióval izoláljuk.

0,5 µg pBR322 plazmidot BamHI és EcoRI restrikciós endonukleázzal kezelünk, és a fragmenseket poliakril-amid gél- elektroforézissel szeparáljuk. A nagy fragmenst elektroelúcióval izoláljuk a gélről, és ezután a szintetizált dezoxi-ribonukleinsavhoz ligáljuk [Goeddel és munkatársai, Nature, 281, 544 (1979)].

A kapott eleggyel E. coli K12 294 sejteket transzformálunk. A transzformációs elegy 5%-át 20 µg/ml ampicillint tartalmazó LB lemezekben szélesztjük. A kapott négy, ampicillinre rezisztens telep tetraciklinre érzékeny; ez azt jelenti, hogy a tetraciklin rezisztenciát meghatározó génbe épült be a dezoxi-ribonukleinsav szekvencia. A négy telepből izolált plazmid analízise szerint a pTH α 1 jellel jelzett termék az alábbiakkal jellemezhető:

a) tartalmaz egy, a pBR322 plazmidban jelen nem levő BglII helyet, ami a 11. ábrán bemutatottak szerint a timozin α 1 gén jelenlétére utal, továbbá

b) tartalmaz a BamHI-EcoRI hasításkor keletkező körülbelül 105 bázispár nagyságú fragmenst.

A pTH α 1 plazmid előállításának sematikus, nem méretarányos ábrázolását a mellékelt 13. ábrán találjuk meg, ahol a vastagon kihúzott vonal az 5'-foszfát-csoportokat jelzi.

3) A kezelt pTH α 1 és az LE' (d) fragmens reakciója

A pTH α 1 plazmid ampicillin rezisztenciát meghatározó gént és egy olyan struktúrgént tartalmaz, amely az 5'-kódoló szál végén az EcoRI helyen és a 3'-vég BamHI helyén a timozin α 1 génnel azonos. A timozingén BglII helyet is tartalmaz. Az LE' (d) fragmenst befogadni képes plazmid előállítására a pTH α 1 plazmidot EcoRI enzimmel emésztjük, majd dTTP és dATP jelenlétében Klenow polimeráz I enzimmel az EcoRI végeken tompa végeket alakítunk ki. A kapott terméket BglII enzimmel emésztve olyan lineáris dezoxi-ribonukleinsav fragmenshez jutunk, amely tartalmazza az ampicillin eszisztenciát meghatározó gént, és ellenkező végein egy ragadós BglII szakaszt és egy tompa véget. A termék recirkulizálható egy BglII ragadós véget és egy tompa véget tartalmazó LE' (d) fragmenssel T4 ligáz jelenlétében. Így kapjuk meg a ptrp 24 plazmidot.

Ennek érdekében a tompa végligáció helyén EcoRI helyet állítunk elő.

E. A pSOM7 Δ 2 plazmid előállítása

A ptrp24 dezoxi-ribonukleinsavat BglII, majd EcoRI enzimmel hasítjuk, poliakril-amid gélelektroforézist és elektroelúciót végzünk, amikor olyan fragmenst kapunk, amely LE' (d) polipeptidet leíró kódonokkal, BglII ragadós véggel és 3'-kódoló végének szomszédosságában egy EcoRI ragadós véggel rendelkezik. Az LE' (d) fragmenst a pSOM7 2 plazmid BglII helyére klónozzhatjuk, amikor a triptofán promotor-operátor rendszer szabályozása alatt álló, kifejeződő polipeptid-szomatosztatin fúziós proteint meghatározó dezoxi-ribonukleinsavhoz jutunk. Úgy járunk el, hogy

1) a pSOM7 Δ 2 plazmidot a triptofán promotor-operátor rendszerhez képest távolabb eső EcoRI hely hasítására részlegesen emésztjük EcoRI enzimmel, majd

2) megfelelően megválasztjuk a primer szekvenciát a kódon megfelelő leolvasási fázisban tartására, és egy EcoRI enzim által felismerhető hely újraelakítására.

16 µg pSOM7 Δ 2 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 200 µl alábbi összetételű pufferban oldunk:

20 mmól trisz, pH=7,5,
5 mmól magnézium-klorid,
0,02% NP40 detergens, és
100 mmól nátrium-klorid.

A dezoxi-ribonukleinsavat 0,5 egység EcoRI enzimmel kezeljük. A reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten tartjuk 15 percen át, majd fenollal, ezután kloroformmal extraháljuk, a terméket etanollal kicsapjuk, és ezután BglII enzimmel emésztjük. A kapott nagyobb fragmenst poliakril-amid gél-elektroforézissel és elektroelúcióval izoláljuk. Ez a fragmens tartalmazza az „LE' (p)” kódonokat, mégpedig az LE' polipeptid proximális végének megfelelő szakaszt. Ez a BglII helytől balra helyezkedik el. Ezt a fragmenst a fentiekben ismertetett LE' (d) fragmenshez ligáljuk T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázal, amikor a pSOM7 Δ 2 Δ 4 plazmidot kapjuk meg. Ezt E. coli K12 294 sejtekbe transzformálva olyan fúziós proteint termelő törzshöz jutunk, amely termeli a teljes LE polipeptidet, és a szomatosztatint; mégpedig a triptofán promotor-operátor rendszer szabályozása alatt.

F. Tetraciklin rezisztenciát meghatározó gén szomszédságában a 3'-végnél PstI szekvenciát, és az 5'-végnél BglII szekvenciát hordozó lineáris dezoxi-ribonukleinsav előállítás

A pBR322 plazmidot HindIII enzimmel emésztjük, és a ragadós HindIII végeket S1 nukleázzal emésztjük. Az S1 nukleázos kezelést úgy végezzük, hogy 10 µg HindIII enzimmel hasított pBR322 dezoxi-ribonukleinsavat az alábbi összetételű S1 puffer 30 µl-ében oldunk:

0,3 mól nátrium-klorid,
1,0 mmól cink-diklorid,
25 mmól nátrium-acétát, pH=4,5.

A reakcióelegyhez 300 egység S1 nukleáz adunk, és a reakciót 30 percen át végezzük 15 °C hőmérsékleten. A reakció leállítására 1 µl alábbi összetételű, 30X S1 nukleáz leállító oldatot adunk:

0,8 mól trisz-bázis és
50 mmól etilén-diamin-tetraecetsav.

Fenollal, majd kloroformmal extraháljuk az elegyet, a terméket etanollal kicsapjuk, és ezután az előzőekben megadottak szerint EcoRI enzimmel emésztjük. Poliakril-amid gél-elektroforézissel és az azt követő elektroelúcióval izoláljuk a fragmenst, ez EcoRI ragadós véggel és egy olyan tompa véggel rendelkezik, amely kódoló szálja timidin nukleotiddal kezdődik. Az S1 nukleázzal emésztett HindIII szekvencia timidinnel kezdődik, ez egy Klenow polimeráz I enzimmel kezelt BglII véghez kapcsolható úgy, hogy ligáció után a BglII enzim által felismerhető szekvencia visszaáll.

Úgy járunk el, hogy az 5. példa C. pontja szerint előállított pSOM7Δ2 plazmidot BglII enzimmel emésztjük, és a kapott BglII ragadós végeket Klenow polimeráz I enzimmel feltöltjük a 4 dezoxi-nukleotid-trifoszfát jelenlétében. A kapott terméket EcoRI enzimmel hasítva, majd a kis fragmenst poliakril-amid gél-elektroforézissel és elektroelúcióval tisztítva olyan lineáris dezoxi-ribonukleinsav fragmenshez jutunk, amely tartalmazza a triptofán promotor-operátor rendszert, és a BglII helytől balra eső LE' proximális (közelebbi) kódjait [LE' (p)].

A termék EcoRI felismerőhellyel és a BglII hely feltöltése miatt egy tompa véggel rendelkezik. Bár a BglII hely bázisszekvenciája visszaáll, az S1 enzimmel emésztett HindIII fragmens tompa végligációja következtében. A két fragmenst T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz jelenlétében összekapcsoljuk, amikor pHKY10 jelű plazmidot kapunk, amit E. coli K12 294 sejtekbe transzformálva szaporítunk. A tetraciklinre rezisztens sejtek hordozzák a pHKY10 plazmidot, ezeket szelektáljuk, és a plazmid dezoxi-ribonukleinsavat extraháljuk. A terméket BglII és PstI enzimmel emésztjük, poliakril-amid gél-elektroforézissel és elektroelúcióval izoláljuk a nagyobb fragmenst, amiután PstI és BglII ragadós végeket tartalmazó lineáris dezoxi-ribonukleinsavat kapunk. A pHKY10 plazmidból származó dezoxi-ribonukleinsav fragmens tartalmazza a replikációs origót, és így felhasználható annak a pHI7Δ4Δ1 plazmidnak az előállítására, amelyben jelen van a trp LE' fúziós

proteint meghatározó génszekvencia, és trp promotor-operátor rendszer szabályozása alatt álló, tetraciklin rezisztenciát meghatározó gén.

G. A trp promotor-operátor rendszert hordozó lineáris dezoxi-ribonukleinsav előállítás

Az 5. példa E. pontja szerint előállított pSOM7Δ2Δ4 plazmidot EcoRI enzimmel részlegesen, és PstI enzimmel teljesen emésztjük. A kapott fragmens tartalmazza a trp promotor-operátor rendszert, ezt a poliakril-amid gél-elektroforézist követő elektroelúcióval izoláljuk. EcoRI enzimmel részlegesen emésztünk, mivel így kapjuk meg azt a fragmenst, amely a szomatosztatin proteint meghatározó gén 5'-végének közelében van hasítva, de nem hasadt az ampicillin rezisztencia gén és a trp promotor-operátor rendszer között levő EcoRI enzim által felismert szakasz mentén. Az ampicillin rezisztenciát meghatározó gén elveszett az ampicillin rezisztencia génen belül eső PstI felismerő hely vágása következtében, azonban az 5. példa F. pontja szerint előállított lineáris pHKY10 dezoxi-ribonukleinsav-származék ligálásakor ez a szekvencia helyreáll.

H. A proinzulin 32 N-terminális aminosavát kódoló szintetikus gén előállítás

18 oligo-nukleotidot állítunk elő (lásd a II. táblázat) a proinzulin első 32 aminosavát meghatározó gén előállításának első lépéseként. A 14. ábrán mutatjuk be a teljes előállított gén nukleotid-szekvenciáját.

II. táblázat

A humán proinzulin szintetikus oligo-nukleotidjai

	Vegyület	Szekvencia
35	H1	AATTCATGTT
	H2	CGTCAATCAGCA
40	H3	CCTTTGTGGTTC
	H4	TCACCTCGTTGA
	H5	TTGACGAACATG
	H6	CAAAGGTGCTGA
	H7	AGGTGAGAACCA
45	H8	AGCTTCAACG
	B1	AGCTTTGTAC
	B2	CTTGTTTGC GGT
	B3	GAACGTGGTTTC
	B4	TTCTACACTCCT
50	B5'	AAGACTCGCC
	B6	AACAAGGTACAA
	B7	ACGTTCAACGCA
	B8	GTAGAAGAAACC
	B9	AGTCTTAGGAGT
55	B10'	GATCCGGCG

A 14. ábrán zárójelek között aláhúzva ábrázoljuk a szintetikus nukleotidokat. Ezeket ismert módon állítjuk elő [Crea és munkatársai, J. Biol. Chem., 250, 4592 (1978) és Itakura és munkatársai, J. Am. Chem. Soc., 97, 7327 (1975)]. Egyes oligo-nukleotidokat felhasználtak az előzőleg leírt humán inzulin Bláncát meghatározó gén előállítására [Crea és munkatársai (1978) és Goeddel és munkatársai (1979)].

A B5' és B10' oligo- nukleotidok HpaII és terminális BamHI és EcoRI restrikciós helyeket tartalmaznak. A terminális felismerhető helyek különösen alkalmasak klónozás céljára.

A H1-H8 jelű, 8 oligo-nukleotidot előzőleg a humán inzulin B- láncát meghatározó gén előállítására használták [Goeddel és munkatársai (1979)], ez tartalmazza a B-lánc génjének azt a részét, amely az 1-13. aminosavat határozza meg, tartalmazza továbbá az N-terminális metionin kódonját. A B-lánc génjének jobb felét a B1, B2, B3, B4, B5', B6, B7, B8, B9 és B10' sorszámú oligo-nukleotidokból állítjuk elő T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal végzett ligálással Goeddel és munkatársai szerint (1979) eljárva. A kapott fragmens kódolja a humán inzulin B-láncának 14-30. aminosavát, és az összekötő lánc első argininjét. A génszekvenciában hasonló leolvasási fázisban egy HpaII restrikciós hely van beépítve, ugyanúgy helyezkedik el, mint a humán inzulin génbe levő HpaII hely. A ligált génfragmens poliakril-amidos gél-elektroforézis tisztítása után elektroelúciót végzünk, és az izolált legnagyobb fragmenst pBR322 plazmidba építjük be HindIII-BamHI hasítást követően. A kapott pBR3 jelű plazmidot E. coli K12 294 sejtekbe transzformáljuk. A plazmid ampicillin és tetraciklin antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát határoz meg, és tartalmazza a kívánt nukleotid szekvenciát.

Ezután két fragmenst ligálunk; a pBR3 plazmid 58 bázispárból álló HindIII-BamHI fragmensét, és a pBH1 plazmid 46 bázispárból álló EcoRI-HindIII fragmensét [lásd Goeddel és munkatársai (1979)]. Így olyan fragmenst kapunk, amely EcoRI és BamHI végekkel rendelkezik. Ezt a fragmenst EcoRI és BamHI enzimekkel hasított pBR322 plazmidba építjük be, ismert módon, és a kapott pIB3 jelű plazmidot E. coli K12 294 sejtekbe transzformáljuk. Sokszorozást és izolálást követően a pIB3 plazmidot EcoRI és HpaII restrikciós endonukleázokkal kezeljük, egy olyan szintetikus génfragmens előállítására (lásd a 15. ábra, 1 fragmensét), amely meghatározza a proinzulin N-terminális aminosavait és a metionint. A szintetikus gént poliakril-amid gél-elektroforézissel ismert módon izoláljuk.

1. A humán proinzulin 50 C-terminális aminosavait meghatározó cDNS izolálása

A mellékelt 16. ábrán adjuk meg a cDNS előállításának sémáját. Az alábbi dezoxi-ribonukleinsav szekvenciát állítjuk elő: pCCGGATCCGGTTT₁₈T. Ez a szekvencia tartalmaz egy BamHI enzim által felismert helyet, és egy körülbelül 20 tagból álló 3'-politimidilsav részt. A szekvenciát felhasználjuk a reverz transzkriptáz által vezérelt cDNS szintézishez. A primert terminális dezoxi-ribonukleinsav-traszferrázzal állítjuk elő [Enzo Biochem., 200 egység] 0,6 ml reakcióelegyben 1 µmol BamHI dekanukleotid jelenlétében, 1,5x10⁻⁴ µmol TTP-vel. A reakciót 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük, Chang és munkatársai által leírt pufferben [Nature, 275, 617 (1978)].

A humán inzulinóma szövetet az alábbi helyen szereztük be: Institute für Diabetesforschung, München, Nyugat-Németország. A témában jártas szakemberek tudják, hogy a humán inzulinóma szövet hozzáférhető, és több más forrásból is beszerezhető. A humán inzulinóma szövetből a poli A hírvívő ribonukleinsav (2,5

µg) izolálható Ullrich és munkatársai szerint [Science, 196, 1313 (1977)]. Ez kétszálú cDNS molekulává alakítható át Wickens és munkatársai szerint [J. Biol. Chem., 253, 2483 (1978)].

5 Úgy járunk el, hogy az alábbi összetételű, 80 µl térfogatú reakcióelegyet 0 °C hőmérsékleten előinkubáljuk:

15 mmól trisz-hidro-klorid (pH=8,3, 42 °C hőmérsékleten),

21 mmól kálium-klorid,

8 mmól magnézium-diklorid,

30 mmól β-merkapto-etanol,

2 mmól dCCGGATCCGGTT₁₈T primer és

1 mmól dNTP.

Ezután reverz transzkriptázt adagolunk, és az elegyet 15 percen át 42 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A kapott ribonukleinsav- dezoxi-ribonukleinsav hibridet ismert módon denaturáljuk.

A komplementer cDNS szálát 150 µl alábbi összetételű reakcióelegyben szintetizáljuk:

25 mmól trisz-hidro-klorid, pH=8,3,

35 mmól kálium-klorid,

4 mmól magnézium-diklorid,

15 mmól β-merkapto-etanol,

1 mmól dNTP és

9 egység Klenow polimeráz I.

Az elegyet 90 percen át 15 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd az inkubálást 4 °C hőmérsékleten 15 órán át folytatjuk. Ezután 2 órán át 1000 egység S1 nukleáz jelenlétében [Miles Laboratories, Elkhart, Indiana] 37 °C hőmérsékleten emésztjük Wickens és munkatársai szerint (1978) eljárva.

A kapott 0,37 µg mennyiségű, kétszálú cDNS terméket 8% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk, és az 500 bázispárnál nagyobb fragmenseket eluáljuk. A fragmens 3'-végeihez terminális dezoxi-nukleotidil transzferrázzal oligo-dezoxi-citidilsav végeket kapcsolunk Maizel szerint eljárva [Meth. Virol., 5, 180 (1971)].

A dC végű cDNS fragmenseket ezután pBR322 plazmidba építjük be, amit előzőleg PstI restrikciós enzimmel kezeltünk, és azután terminális dezoxi-nukleotidil transzferrázzal dezoxi-guanidilsav véggel látunk el. A kapott plazmidokkal E. coli K12 294 sejteket transzformálunk, és a kapott izolátumokat LB és TET táptalajon szélesztjük. A tetraciklin rezisztens, de ampicillin antibiotikumra érzékeny telepeket izoláljuk, és bizonyítjuk a három PstI restrikciós hellyel rendelkező plazmidok jelenlétét.

Ez a restrikciós kép jelzi a proinzulin gén jelenlétét [Sures és munkatársai, Science, 208, 57 (1980)]. Egy plazmidot pH1104 jellel jelöltünk, ez egy 600 bázispárból álló beépített szakaszt tartalmaz, és adja a várt PstI restrikciós képet. Tartalmazza továbbá a cDNS preparálása során bevezetett 3'-poliA és poliGC szakasz között a BamHI helyet. A 14. ábrán mutatjuk be a beépített szakasz bizonyos nukleotid szekvenciáját.

J. A humán proinzulint kódoló gén összeállítása

A humán proinzulint kódoló gén összeállításának sémáját a mellékelt 15. ábrán mutatjuk be. A 15.

ábrán 1 számmal jelzett fragmens egy szintetikus génszegmens, amely a proinzulin első 31 aminosavát kódolja. Ezt 50 µg pIB3 plazmidból állítjuk elő, a fentiek szerint EcoRI és HpaII restrikciós endonukleázokkal hasítva. Ez a fragmens tartalmaz továbbá egy metionint kódoló ATG kódot a preproinzulin preszekvenciája helyett.

A 32–86. aminosavakat és a mRNS molekula 3'-nem transzlatált régióját, illetve a transzlációs stop jelet tartalmazó cDNS génszegmenst 40 µg pHI104 plazmidból állítjuk elő BamHI és azt követő HpaII restrikciós enzimmel való hasítással. A két fragmenst poliakril-amid gél-elektroforézissel és az azt követő elektroelúcióval izoláljuk. A két génfragmenst ezután T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal 20 µl ligáz pufferban összekapcsoljuk. A reakciót 4 °C hőmérsékleten végezzük 24 órán át. 50 µl vízzel hígítjuk az elegyet, és fenollal, majd kloroformmal ismert módon extraháljuk és azután etanollal kicsapjuk a terméket.

A kapott dezoxi-ribonukleinsavat BamHI és EcoRI restrikciós enzimekkel kezeljük, ezen felismerő helyek regenerálására és a génpolimeriek eltávolítására. Az összeállt proinzulin gént poliakril-amid gélen kivitelezett elektroforézissel tisztítjuk, és pBR322 plazmidba építjük, EcoRI és BamHI emésztést és T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal kivitelezett ligálással. A kapott dezoxi-ribonukleinsavat *E. coli* K12 294 sejtekbe transzformáljuk, és a kapott telepeket tetraciklin érzékenységre és ampivillin rezisztenciára vizsgáljuk.

Az egyik telepből izolált pHI3 plazmid tartalmazza a kívánt proinzulin gént, amit nukleotidszekvencia analízissel jellemezünk.

K. A humán proinzulint tartalmazó kimeraprotein kifejezésére alkalmas plazmid előállítás

A teljes humán proinzulin gént, amely tartalmazza a metionint kódoló N-terminális kódot is, a pHI3 plazmidból izoláljuk EcoRI és BamHI restrikciós enzimes kezeléssel. A fragmenst gél-elektroforézissel tisztítjuk, és ezután T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal ligáljuk az 5. példa G. pontja szerint előállított pSOM7Δ 2Δ plazmidból származó PstI-EcoRI részleges emésztéssel kapott fragmenshez, és az 5. példa F. pontja szerint kapott pHKY10 plazmid nagyobb PstI-BglII fragmenséhez.

1 µg EcoRI és BamHI végekkel rendelkező komplett humán proinzulin gént, 4 µg pSOM7Δ2Δ PstI-EcoRI (részleges) fragmenst és 1 µg pHKY10 PstI-BglII fragmenst ligálunk T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal, ligáláshoz használt pufferben, 4 °C hőmérsékleten 24 órán át. A ligált dezoxi-ribonukleinsav eleggyel *E. coli* K12 294 sejteket transzformálunk. Ampicillin és tetraciklin antibiotikumok jelenlétében növekvő telepeket szelektálunk, és ezekben megtaláljuk a pHI7Δ4Δ1 plazmidot, amely olyan proteint fejez ki, amelynek molekulatömege azonos a várt trp LE'-proinzulin fúziós peptid várt molekulatömegének.

A fenti proteint kifejező pHI7Δ4Δ1 plazmidot teljes mértékben jellemezünk, mind a dezoxi-ribonukleinsav szekvencia megállapításával, mind pedig a beépült gén és a vektor dezoxi-ribonukleinsav restrikciós helyeinek vizsgálatával.

A pHI7Δ4Δ1 plazmidot a mellékelt 15. ábrán mutatjuk be. A plazmid könnyen szelektálható, mivel

az ampicillin és tetraciklin antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát meghatározó gén a klónozás során helyreállt.

5 6. példa

A pNM608 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pNM608 törzs előállítás

A. pHI7Δ4Δ1 plazmid 253 bázispárból álló EcoRI-HpaI fragmensének előállítás

10 5 µg pHI7Δ4Δ1 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat, 10 µl (10X) alábbi összetételű reakciópuffert, 80 µl vizet és 5 µl (5 egység) HpaI restrikciós enzimet keverünk:

15 100 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,0,
100 mmól magnézium-diklorid,
60 mmól β-merkapto-etanol,
200 mmól kálium-klorid.

20 A reakciót 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük. A reakció leállítására 5 percen át 70 °C hőmérsékleten való inkubálással történt. Ezután jégfürdőben lehűtjük az elegyet, 12 µl 1 mólos pH=7,2-jű trisz-hidro-klorid-oldatot, 7 µl vizet és 1 µl (10 egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk hozzá. A kapott elegyet

25 először 1 órán át 37 °C hőmérsékleten, majd ezután 5 percen át 70 °C-on inkubáljuk. Jégfürdőben lehűtjük az elegyet, és a kapott dezoxi-ribonukleinsavat fenollal és kloroform:izoamil-alkohol (24:1) arányú eleggyel extraháljuk, majd etanollal kicsapjuk.

30 Az előállítandó 253 bázispárból álló EcoRI-HpaI restrikciós fragmenst poliakril-amid gél-elektroforézissel és elektroelúcióval különítjük el, etanollal kicsapjuk, és a kicsapódott terméket 10 µl TE-pufferban oldjuk, az oldathoz pedig felhasználásig 0 °C hőmérsékleten tároljuk.

B. A pHI7Δ4Δ1 plazmid 34 bázispárból álló HpaI-TaqI fragmensének előállítás

40 32 µl (5X) alábbi összetételű EcoRI pufferban 20 µg pHI7Δ4Δ1 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat, 124 µl vizet és 4 µl (20 egység) EcoRI restrikciós enzimet inkubálunk 37 °C hőmérsékleten, 1 órán át:

45 250 mmól nátrium-klorid,
500 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,2,
25 mmól magnézium-diklorid,
30 mmól β-merkapto-etanol.

50 A reakció leállítására 5 percen át 70 °C hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet. A kapott 862 bázispárból álló EcoRI fragmenst 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen végzett elektroforézissel és az azt követő elektroelúcióval izoláljuk. A terméket etanollal

55 csapjuk ki. A fragmenst ezután 100 µl, 16 egység HpaI restrikciós enzimet tartalmazó HpaI pufferban oldjuk. 37 °C hőmérsékleten inkubálunk 1,5 órán át, majd 7,5 egység TaqI restrikciós enzimet adagolunk. Az inkubációt további 1,5 órán át folytatjuk, majd a fragmenseket ismert módon különítjük el 7,5% poliakril-amidot tartalmazó gélen. Az előállítani kívánt, 34 bázispárból álló HpaI-TaqI fragmenst elektroelúcióval és etanolos kicsapással különítjük el, majd 5 µl TE-pufferban oldjuk.

C. A pBR322 plazmid emésztése EcoRI-ClaI enzimekkel

37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk az alábbi összetételű reakcióelegyet:

5 µg pBR322 dezoxi-ribonukleinsav,
10 µl ClaI reakcióelegy (100 mmól
tris-hidro-klorid, pH=7,4),
100 mmól magnézium-diklorid,
60 mmól β-merkapto-etanol,
77,5 µl víz és
7,5 µl (15 egység) ClaI restrikciós enzim.

A reakció leállítására 5 percen át 70 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet. Jégfürdőben lehűtjük, majd pH=7,2-jű 12,5 µl 1 mólos trisz-hidro-klorid-oldatot, 6,25 µl 1 mólos nátrium-klorid-oldatot, 2,5 µl 0,1 mólos magnézium-diklorid-oldatot és 1 µl (10 egység) EcoRI restrikciós enzimet adagolunk hozzá. 1 órán át 37 °C hőmérsékleten, majd 5 percen át 70 °C-on inkubáljuk a reakcióelegyet. Jégfürdőben lehűtjük, majd a kapott dezoxi-ribonukleinsavat 1% agarózt tartalmazó gélen elektroforézissel szétválasztjuk. A nagyobb fragmenst elúcióval izoláljuk, etanollal kicsapjuk, és 20 µl TE-pufferban oldjuk, majd felhasználásig 0 °C hőmérsékleten tároljuk.

D. Ligálás és transzformálás

A 6. példa A. pontja szerint előállított 253 bázispárból álló EcoRI-HpaI fragmens 0,2 µg-ját, a 6. példa B. pontja szerint előállított 0,5 µg HpaI-TaqI fragmenst és a 6. példa C. pontja szerint előállított 0,1 µg EcoRI-ClaI dezoxi-ribonukleinsavat ligálunk, és ezután E. coli K12 RV308 sejtekbe transzformálunk, a 2. példa D. pontja szerint eljárva.

A transzformánsok közül néhány, ahogy azt az agaróz gélen végzett elektroforézis [Maniatis és munkatársai (1982)] és más vizsgálatok mutatják, csak a 4,6 kb nagyságú plazmidot hordozzák. Az egyik ilyen transzformáns E. coli K12 RV308/pNM608 jellel jelölünk, szelektáljuk, megfelelő antibiotikumokat tartalmazó TY agaron szélesztjük, és ismert mikrobiológiai technikákat használva tenyésztjük. A pNM608 plazmid izolálás után forrása a pHI7Δ4Δ1 plazmid 217 bázispárból álló EcoRI-ClaI (TaqI) fragmensének.

7. példa

A pCZ112 plazmid és az E. coli K12 RV308/pCZ112 törzs előállítása

A. A pNM608 plazmid emésztése EcoRI-ClaI enzimekkel, és a 0,288 kb nagyságú EcoRI-TaqI előállítása (azonos a pHI7Δ4Δ1 plazmid 0,288 kb nagyságú EcoRI-TaqI fragmensével)

5 µg pNM608 dezoxi-ribonukleinsavat inkubálunk 10 egység EcoRI és 10 egység ClaI restrikciós enzimmel 37 °C hőmérsékleten, 1 órán át 50 µl alábbi összetételű só-pufferban:

50 mmól nátrium-klorid,
100 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,5,
6 mmól magnézium-diklorid,
2 mmól β-merkapto-etanol.

5 µl 3 mólos nátrium-acetát-oldatot (pH=7,0) adunk az elegyhez, majd a dezoxi-ribonukleinsavat 3 térfogat 100%-os etanollal kicsapjuk. A dezoxi-ribonukleinsav

terméket 100 µl TE-pufferban oldjuk, és felhasználásig 0 °C hőmérsékleten tároljuk.

B. A dezoxi-ribonukleinsav linker szekvencia előállítása

Az alábbi linker szekvenciát állítjuk elő:

```

5' CGACC ATG GAT GAT AAG TTT CCG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
10 3' TGG TAC CTA CTA TTC AAA GGC

      GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
      CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

      TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
      ||| ||| ||| ||| |||
      AAA CGG TTG CGA C 5'.
```

A szintézist Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) módosított foszfo-triészter módszerével végezzük. A szintézis módszerét az 1. példában részleteztük.

C. Ligálás és transzformálás

A 7. példa B. pontjában megadott dezoxi-ribonukleinsav linker 20 pM-nyi mennyiségét, 1 µg pNM608 plazmid, a 7. példa A. pontja szerint előállított fragmensét, és 0,5 µg pCZ101 plazmidból származó, 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmenst, továbbá 1 µg, a 3. példa B. pontja szerint előállított, pCZ101 plazmidból származó, 0,69 kb nagyságú BamHI-HgiAI fragmenst ligálunk. A 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmenst a 2. példa B. pontja szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy az XbaI restrikciós enzim és a hozzá tartozó puffer helyett EcoRI restrikciós enzimet és a megfelelő puffert használjuk.

A ligálást követően kapott plazmiddal E. coli K12 RV308 sejteket transzformálunk, a 2. példa D. pontja szerint eljárva.

A kapott transzformánsok közül néhány az agaróz gélen végzett elektroforézis [Maniatis és munkatársai (1982)] és más vizsgálatok szerint csak az adott 10,8 kb nagyságú plazmidot tartalmazzák. Egy ilyen transzformáns E. coli K12 RV308/pCZ112 jellel szelektálunk, TY agaron, kanamicin jelenlétében szélesztünk, és ismert mikrobiológiai technikákat használva tenyésztünk. A kapott sejtek az SDS gél-elektroforézis, RIA és más vizsgálatok szerint kifejezik az Met-Asp-Asp-Lys-bGH származékot. A kifejezett termék mennyisége nagy. Mivel a pCZ112 plazmid termoindukálható úgynevezett „runaway” replikont tartalmaz, amely az indukció körülményei között elveszti a plazmid példányszám-szabályozási képességét, 37 °C hőmérsékleten a tenyészetben az adott bGH származék maximális kifejeződése következik be.

8. példa

A PAT1 plazmid és az E. coli K12 RV308/pAT1 törzs előállítása

A 7. példa szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az alábbi dezoxi-ribonukleinsav linker szekvenciát állítjuk elő, a 7. példában megadott helyett:

5' CGACA ATG TTC CCA GCT ATG TCT
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGT TAC AAG GGT CGA TAC AGA

CTA TCT GGT CTG TTT GCC AAC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 GAT AGA CCA GAC AAA CGG TTG

GCT GTGCT 3'
 ||| |||
 CGA C 5'.

A fenti linker szekvenciát Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) szerint állítjuk elő. A szintézis módszerét részletesen szemléltettük az 1. példában.

A kapott, itt *E. coli* K12 RV308/pAT1 transzformánsokat kanamicint tartalmazó TY agaron szélesztjük, és ezután a pAT1 plazmid termelésére és izolálására ismert módon tenyésztjük. A transzformánsok az SDS gél-elektroforézis vizsgálat, a RIA és más vizsgálatok szerint jelentős mértékben fejezi ki a fentiekben megadott Met-bGH származékot. Mivel a pAT1 plazmid termoindukálható „elveszthető”, úgynevezett runaway replikont tartalmaz, amely az indukció körülményei között nem képes szabályozni a példányszámot, a bGH származék kifejeződése maximális mértékben bekövetkezik 37 °C tenyésztési hőmérsékleten.

9. példa

A pASP1 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pASP1 törzs előállítása

A 7. példában megadottakat ismételjük meg, azzal a különbséggel, hogy a 7. példában ismertetett linker szekvencia helyett az alábbi dezoxi-ribonukleinsav szekvenciát használjuk:

5' CGACC ATG GAT TTT CCG GCT ATG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGG TAC CTA AAA GGC CGA TAC

TCT CTG TCC GGC CTG TTT GCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 AGC GAC AGG CCG GAC AAA CGG

AAC GTGCT 3'
 ||| ||| |||
 TTG CGA C 5'.

A fenti linker szekvenciát Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) ismert módszerei szerint állítjuk elő. A szintézist az 1. példában részletesen ismertettük.

Az itt *E. coli* K12 RV308/pASP1 jellel jelölt transzformánsokat megfelelő antibiotikumokat tartalmazó TY agaron szélesztjük, és a pASP1 plazmid termelésére és izolálására ismert módon tenyésztjük. A transzformánsok az SDS gél-elektroforézis, a RIA vizsgálat és más kísérletek szerint nagymértékben kifejezik a fentiekben ismertetett Met-Asp-bGH származékot.

Mivel a pASP1 plazmid termoindukálható, úgynevezett „runaway” replikont tartalmaz, a bGH származék kifejeződése 37 °C hőmérsékleten végzett

tenyésztéskor maximális mértékben bekövetkezik, mivel a replikon az indukció körülményei között nem szabályozza a plazmid példányszámát.

10. példa

A pASP2 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pASP2 törzs előállítása

A 7. példában megadottakat ismételjük meg, azzal a különbséggel, hogy a 7. példában használt linker szekvencia helyett az alábbi dezoxi-ribonukleinsav szekvenciát használjuk:

5' CGATC ATG GAT TTT CCG GCT ATG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 15 TAG TAC CTA AAA GGC CGA TAC

TCT CTG TCC GGC CTG TTT GCC
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 AGA GAC AGG CCG GAC AAA CGG

AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| |||
 TTG CGA C 5'.

25 A linker szekvencia előállítására Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) szerint járunk el. A szintézis módszerét az 1. példában részletesen ismertettük.

Az itt *E. coli* K12 RV308/pASP2 jellel jelzett transzformánsokat kanamicint tartalmazó TY agaron szélesztjük, és ezután a pASP2 plazmid termelésére és izolálására ismert módon tenyésztjük. A transzformánsok az SDS gél-elektroforézis, RIA és más vizsgálatok szerint nagymértékben fejezik ki az előzőekben ismertetett Met-Asp-bGH származékot.

Mivel a pASP2 plazmid termoindukálható, úgynevezett runaway replikont tartalmaz, 37 °C tenyésztési hőmérsékleten a kívánt bGH származék maximális mértékben fejeződik ki, mivel a replikon nem szabályozza a példányszámot.

11. példa

A pAT2 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pAT2 törzs előállítása

45 A 3. példában megadottakat ismételjük meg, azzal a különbséggel, hogy a 3. példa C. pontjában megadott linker szekvencia helyett az alábbi dezoxi-ribonukleinsav linker szekvenciát használjuk:

50 5' CTAGAGGGTA TTAATA ATG TTT CCA
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TCCCA TAATTA T TAC AAA GGT

GCT ATG TCT CTA TCT GGT CTG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 CGA TAC AGA GAT AGA CCA GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| ||| ||| |||
 60 AAA CGG TTG CGA C 5'.

A fenti linker szekvenciát Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) szerint állítjuk elő ismert módon. A fenti szintézis módszert az 1. példában részletesen ismertettük.

Az itt *E. coli* K12 RV308/pAT2 jellel jelzett transzformánsokat TY agaron szélesztjük megfelelő antibiotikumok jelenlétében, és ezután a pAT2 plazmid termelésére és izolálásra ismert módon tenyésztjük. A transzformánsok az SDS gélelektroforézis, RIA és más vizsgálatok szerint a fenti Met-bGH származékot nagymértékben kifejezik. A pAT2 plazmid termoindukálható, úgynevezett „runaway” replikont tartalmaz, ezért 37 °C tenyésztési hőmérsékleten az adott bGH származék maximális kifejeződése követ-

kezik be, mivel a replikon nem szabályozza a példányszámot.

12. példa

5 A pCZ154 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pCZ154 törzs előállítás

A 7. példában megadottakat ismételjük meg, azzal a különbséggel, hogy a 7. példában használt linker szekvencia helyett az alábbi dezoxi-ribonukleinsav linker szekvenciát használjuk:

```

5' CGACC ATG GTT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
   TGG TAC CAA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

      TTT GCC AAC GCT GTGCT      3'
      ||| ||| ||| ||| |||
      AAA CGG TTG CGA C          5'

```

A fenti linker szekvenciát Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) szerint állítjuk elő. A szintézis módszerét az 1. példában részletesen megadtuk.

Az e helyen *E. coli* K12 RV308/pCZ154 jellel jelzett transzformánsokat megfelelő antibiotikumokat tartalmazó TY agaron szélesztjük, és a pCZ154 plazmid termelésére és izolálására ismert módon tenyésztjük.

A transzformánsok az SDS gélelektroforézis, RIA és más vizsgálatok szerint nagymértékben fejezik ki az előzőekben meghatározott Met-Val-bGH származékot.

A pVZ154 plazmid termoindukálható, úgynevezett „runaway”, a példányszám szabályozását az indukció körülményei között elvesztő replikont tartalmaz, így 37 °C tenyésztési hőmérsékleten az adott bGH származék maximálisan kifejeződik.

13. példa

5 A pCZ155 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pCZ155 törzs előállítás

A 7. példában megadottakat ismételjük meg, azzal a különbséggel, hogy a 7. példában megadott linker szekvencia helyett az alábbi dezoxi-ribonukleinsav linker szekvenciát használjuk:

```

5' CGACC ATG GCT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GTC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
   TGG TAC CGA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CAG GAC

      TTT GCC AAC GCT GTGCT      3'
      ||| ||| ||| ||| |||
      AAA CGG TTG CGA C          5'

```

A linker szekvenciát Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) szerint állítjuk elő. Ezt a szintézis módszert az 1. példában részletesen ismertettük.

Az *E. coli* K12 RV308/pCZ155 transzformánsokat TY agaron szélesztjük megfelelő antibiotikumok jelenlétében, és a pCZ155 plazmid izolálására és termelésére ezután ismert módon tenyésztjük. A transzformánsok nagymértékben kifejezik az SDS gélelektroforézis, RIA és más vizsgálatok szerint az előzőekben ismertetett, alábbi származékot: Met-Ala-Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu-Ser-Val-b'GH.

A pCZ155 plazmid termoindukálható replikont tartalmaz, ez a replikon az indukció körülményei között nem szabályozza a példányszámot, így 37 °C-on tenyésztve a bGH származék maximális mértékben fejeződik ki.

14. példa

50 A pCZ156 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pCZ156 törzs előállítás

A 7. példában megadottakat ismételjük meg, azzal a különbséggel, hogy a 7. példában megadott linker szekvencia helyett az alábbi dezoxi-ribonukleinsav linker szekvenciát használjuk:

```

5' CGATA ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3' TAT TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

      TTT GCC AAC GCT GTGCT      3'
      ||| ||| ||| ||| |||
      AAA CGG TTG CGA C          5'

```

A linker szekvenciát Itakura és munkatársai (1977) és Crea és munkatársai (1978) szerint állítjuk elő. Ezt a szintézist az 1. példában részletesen szemléltettük.

Az *E. coli* K12 RV308/pCZ156 transzformánsokat megfelelő antibiotikumon TY agaron szélesztjük, és ezután a pCZ156 plazmid termelésére és izolálására ismert módon tenyésztjük. A transzformánsok az SDS gélelektroforézis, RIA és más vizsgálatok szerint nagymértékben fejezik ki az előzőekben ismertetett Met- Asp-bGH származékot. Mivel a pCZ156 plazmid termoindukálható replikont tartalmaz, amely az indukció körülményei között nem szabályozza a példányszámot, 37 °C hőmérsékleten tenyésztve a sejtek maximális mértékben fejezik ki az adott bGH származékot.

15. példa

A pCZ103 plazmid és az *E. coli* K12 RV308/pCZ103 sejtek előállítása

10 µl alábbi összetételű 10X BstEII reakciópufferban 10 µg pCZ101 plazmidot oldunk:

1,5 mól nátrium-klorid,
60 mmól trisz-hidro-klorid, pH=7,9,
60 mmól magnézium-diklorid,
60 mmól 2-merkapto-etanol és
1 mg/ml borjú szérum albumin.

Az elegyhez 2 µl (20 egység) BstEII restrikciós enzimet és 88 µl vizet adunk, majd 2 órán át 60 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet. 0,25 mól nátrium- acetát-oldatot adagolunk, majd fenollal és kloroformmal extrahálunk, és a dezoxi-ribonukleinsavat etanolos kicsapásokkal különítjük el.

0,1 µg BstEII enzimmel emésztett pCZ101 dezoxi-ribonukleinsavat 100 µl ligáz pufferban oldunk. 100 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz adagolunk az oldathoz, és 2 órán át 16 °C hőmérsékleten inkubálunk. A ligált dezoxi-ribonukleinsavval *E. coli* K12 RV308 sejteket transzformálunk. Az *E. coli* K12 RV308/pCZ103 transzformánsokat kanamicint tartalmazó táptalajon szelektáljuk, és a plazmid dezoxi-ribonukleinsavat restrikciós enzimes analízissel azonosítjuk.

A pCZ103 plazmidot a transzformánsokból a 2. példa A. pontja szerint eljárva izoláljuk.

16. példa

A pCZ103 plazmidból származó vektorok előállítása a borjú növekedési hormon származékok kifejezésére

Mivel a pCZ103 plazmid előállításakor létrehozott BstEII delécio nem befolyásolja a bGH proteint kódoló szekvenciát, a találmány szerinti pCZ103 plazmidból származó plazmidok ugyanazt a bGH származékot fejezik ki, mint a pCZ101 plazmidból származtatható származékok. A találmány szerinti pCZ103 plazmid származékok előállítására azon példák szerint járunk el, amelyekben a megfelelő pCZ101 plazmid származékot állítjuk elő, a III. táblázatban röviden összegezzük a pCZ103 plazmidból származó plazmidok előállítását. A III. táblázatban megadjuk a pCZ103-ból származtatható plazmidokat, a megfelelő pCZ101 plazmidpár előállítását ismertető példát és az előállítás során felhasznált különböző dezoxi-ribonukleinsav fragmens nagyságát.

III. táblázat

A pCZ103-ból származtatható vektorok előállítása a bGH származékok kifejezésére

pCZ103-ból származtatható vektor	Megfelelő példa száma	A felhasznált különböző restrikciós fragmens	Megjegyzés
pJR1.3	4.	A pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-XbaI restrikciós fragmensét használjuk a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-XbaI restrikciós fragmense helyett.	A felhasznált egyéb dezoxi-ribonukleinsav fragmensek azonosak a megadott példákban használt fragmensekkel. A pCZ101 és pCZ103 plazmidok 0,6 kb nagyságú BamHI-HgiAI restrikciós fragmensei azonosak.
pAT1.3	8.	A pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI restrikciós fragmensét használjuk a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI restrikciós fragmense helyett.	A felhasznált dezoxi-ribonukleinsav fragmensek a megadott példákban felhasználtakkal azonosak.
pASP1.3	9.		
pASP2.3	10.		
pCZ154.3	12.		
pCZ155.3	13.		
pCZ156.3	14.		

A pCZ103 plazmidból származó plazmidokat *E. coli* K12 RV308 sejtekbe transzformáljuk. A transzformánsok kifejezik az előzőekben ismertetett bGH származékokat.

Mivel a pCZ103-ból származó plazmidok termoindukálható replikont tartalmaznak, amely az indukció körülményei között nem szabályozza a plazmid példányszámát, 37 °C hőmérsékleten tenyésztve maximális kifejeződés következik be.

5' CTAGAGGGTATTAATA ATG TTT CCA GCC ATG GCT CTA TCT GGT
 |||||
 3' TCCCATAATT AT TAC AAA GGT CGG TAC CGA GAT AGA CCA

CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 |||||
 GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

és a pCZ101 plazmid 0,6 kb nagyságú BamHI-XbaI
fragmensét ligáljuk.
(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

10

plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI- XbaI fragmen-
sét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi- ri-
bonukleinsav linkert

7. A 4 igénypont szerinti eljárás a pAT2 plazmid előállítására, *azzal jellemezve, hogy a pCZ101*

5' CTAGAGGGTATTAATA ATG TTT CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT
 |||||
 3' TCCC ATAATTAT TAC AAA GGT CGA TAC AGA GAT AGA CCA

CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 |||||
 GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

és a pCZ101 plazmid 0,6 kb nagyságú BamHI-XbaI
fragmensét ligáljuk.

25

előállítására, azzal jellemezve, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-XbaI fragsmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

8. A 4. igénypont szerinti eljárás a pJR1.3 plazmid

5' CTAGAGGGTATTAATA ATG TTT CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT
 |||||
 3' TCCCA TAATTAT TAC AAA GGT CGA TAC AGA GAT AGA CCA

CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 |||||
 GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

és a pCZ101 plazmid 0,6 kb nagyságú BamHI-XbaI
fragmensét ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

9. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, 40
hogy a translációk aktivációs szekvenciaként az
E. coli triptofán szekvenciát alkalmazzuk.

10. A 9. ígéypont szerinti eljárás a pCZ112 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmenst, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

5' CGACC ATG GAT GAT AAG TTT CCG GCT ATG TCT CTG
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGG TAC CTA CTA TTC AAA GGC CGA TAC AGA GAC

TCC GGC CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 AGG CCG GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmensét ligáljuk. (Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

11. A 9. igénypont szerinti eljárás a pAT1 plazmid előállítására, *azzal jellemezve, hogy a pCZ101* 55

plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI- EcoRI frag-
mensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-
ribonukleinsav linkert

5' CGACA ATG TTC CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 3' TGT TAC AAG GGT CGA TAC AGA GAT AGA CCA

 CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT 3'
 ||| ||| ||| ||| ||| |||
 GAC AAA CGG TTG CGA C 5'

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

12. A 9. igénypont szerinti eljárás a pASP1 plazmid

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'  TGG TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGC GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT
||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

13. A 9. igénypont szerinti eljárás a pASP2 plazmid

15

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GTT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'  TAG TAC CAA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT
||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmensét ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

14. A 9. igénypont szerinti eljárás a pCZ154 plazmid

30

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'  TGG TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT
||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1984. 07. 26.)

15. A 9. igénypont szerinti eljárás a pCZ155 plazmid

45

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GCT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GTC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
4'  TGG TAC CGA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CAG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT
||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 EcoRI-ClaI fragmensét ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1984 07 26)

16. A 9. igénypont szerinti eljárás a pCZ156 plazmid

55

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmid 10,2 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGATA ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'  TAT TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT
||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.
(Elsőbbsége: 1984. 07. 26.)
17. A 9. igénypont szerinti eljárás a pAT2.3 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103

plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CTAGAGGGTATTAATA ATG TTT CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3'   TC CCATAATTAT TAC AAA GGT CGA TAC AGA GAT AGA CCA

CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT          3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GAC AAA CGG TTG CGA C              5',

```

és a pCZ101 plazmid 0,6 kb nagyságú BamHI-XbaI fragmensét ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

18. A 9. igénypont szerinti eljárás a pAT1.3 plazmid

15

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACA ATG TTC CCA GCT ATG TCT CTA TCT GGT
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3'   TGT TAC AAG GGT CGA TAC AGA GAT AGA CCA

CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT          3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GAC AAA CGG TTG CGA C              5',

```

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

19. A 9. igénypont szerinti eljárás a pASP1.3 plazmid

30

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3'   TGG TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGC GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT          3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C              5',

```

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

20. A 9. igénypont szerinti eljárás a pASP2.3

45

plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGATC ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3'   TAG TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT          3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C              5',

```

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

21. A 9. igénypont szerinti eljárás a pCZ154.3

55

plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GTT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3'   TGG TAC CAA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

TTT GCC AAC GCT GTGCT          3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
AAA CGG TTG CGA C              5',

```

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmensét ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

22. A 9. igénypont szerinti eljárás a pCZ155.3 plazmid

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGACC ATG GCT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GTC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'  TGG TAC CGA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CAG GAC

   TTT GCC AAC GCT GTGCT
   ||| ||| ||| ||| |||
   AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

23. A 9. igénypont szerinti eljárás a pCZ156.3 plazmid

15

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ103 plazmid 9,3 kb nagyságú BamHI-EcoRI fragmensét, az alábbi nukleotid szekvenciájú dezoxi-ribonukleinsav linkert

```

5' CGATA ATG GAT TTT CCG GCT ATG TCT CTG TCC GGC CTG
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'  TAT TAC CTA AAA GGC CGA TAC AGA GAC AGG CCG GAC

   TTT GCC AAC GCT GTGCT
   ||| ||| ||| ||| |||
   AAA CGG TTG CGA C

```

3'

5',

és az NM608 plazmid EcoRI-ClaI fragmenseit ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

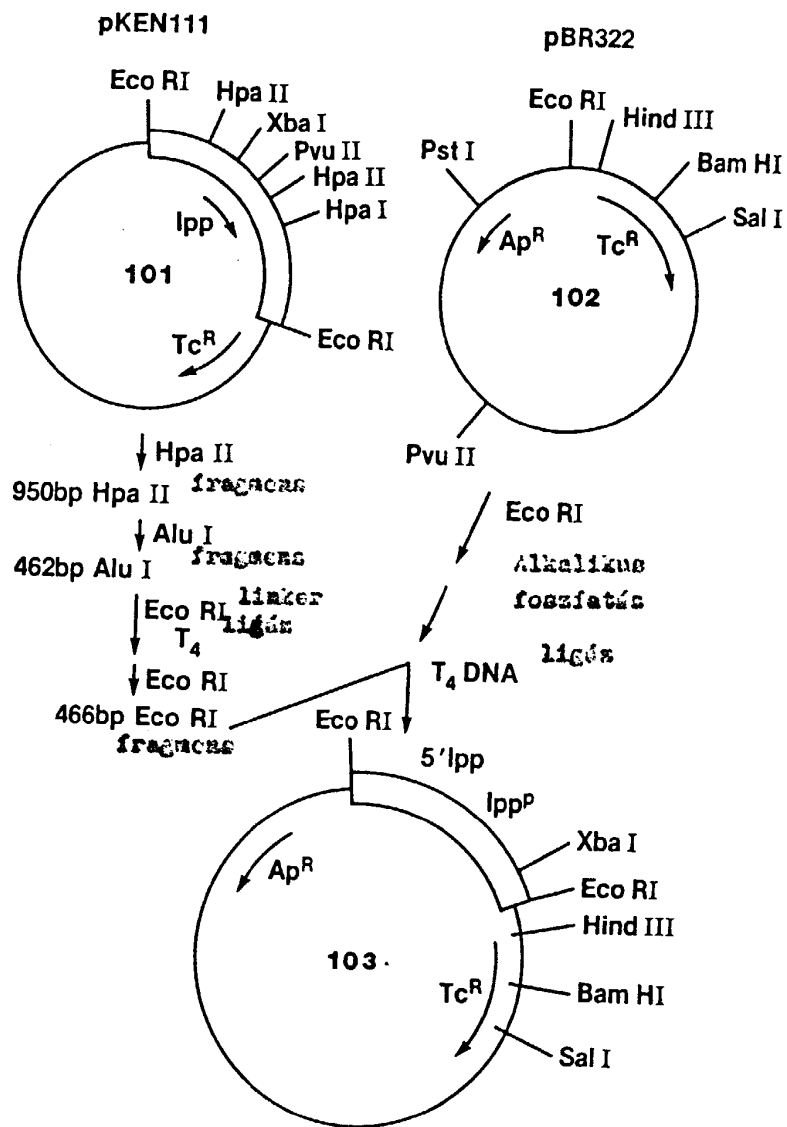
24. Eljárás a 8. és 17-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárásban használható plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pCZ101 plazmidot

30

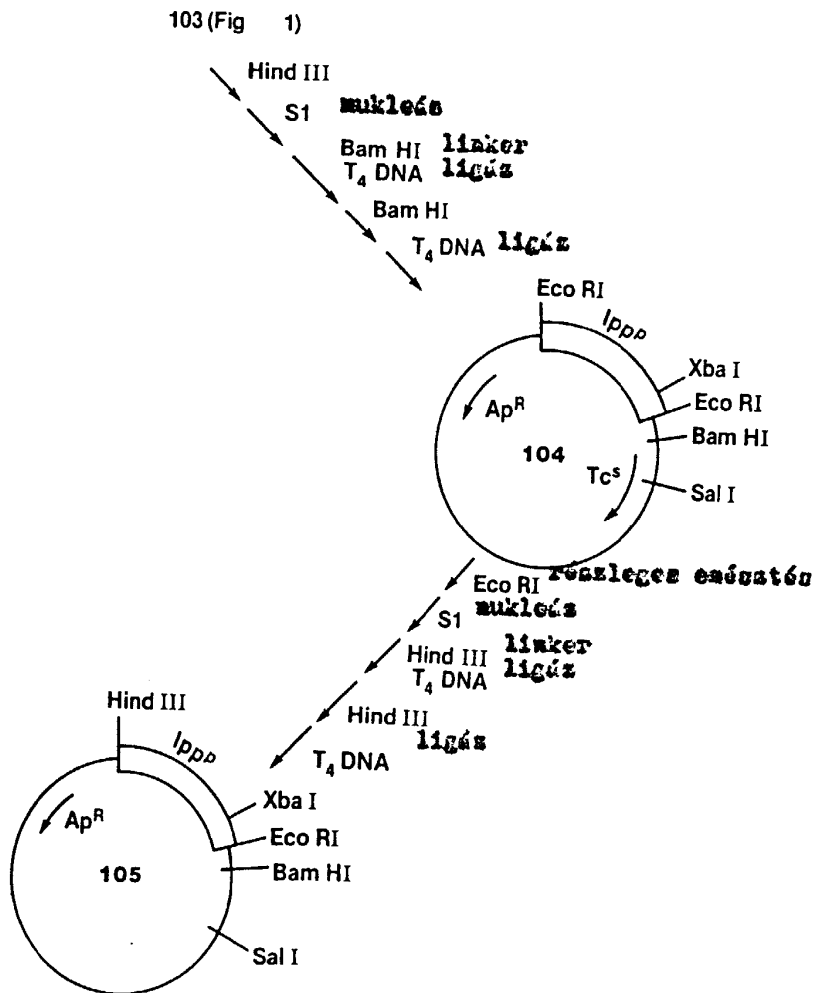
BstEII restrikciós enzimmel kezeljük, az így kapott dezoxi-ribonukleinsavat tisztítjuk, és a tisztított dezoxi-ribonukleinsavat a pCZ103 plazmid előállítására ligáljuk.

(Elsőbbsége: 1985. 01. 31.)

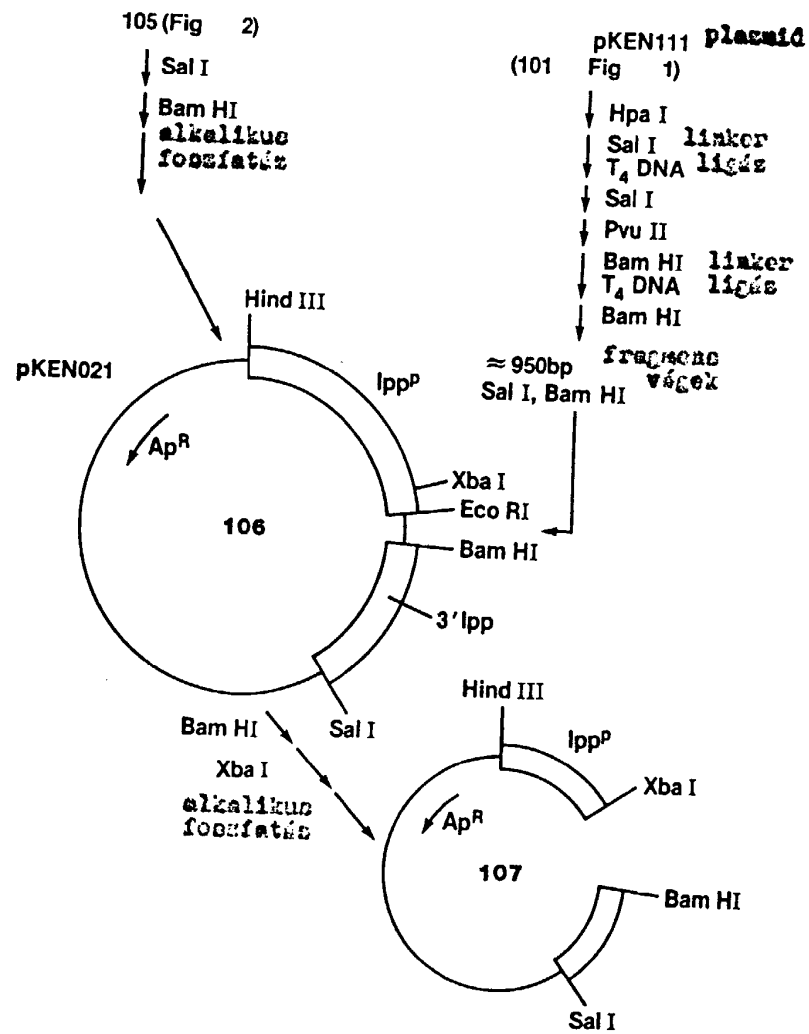
1. ábra



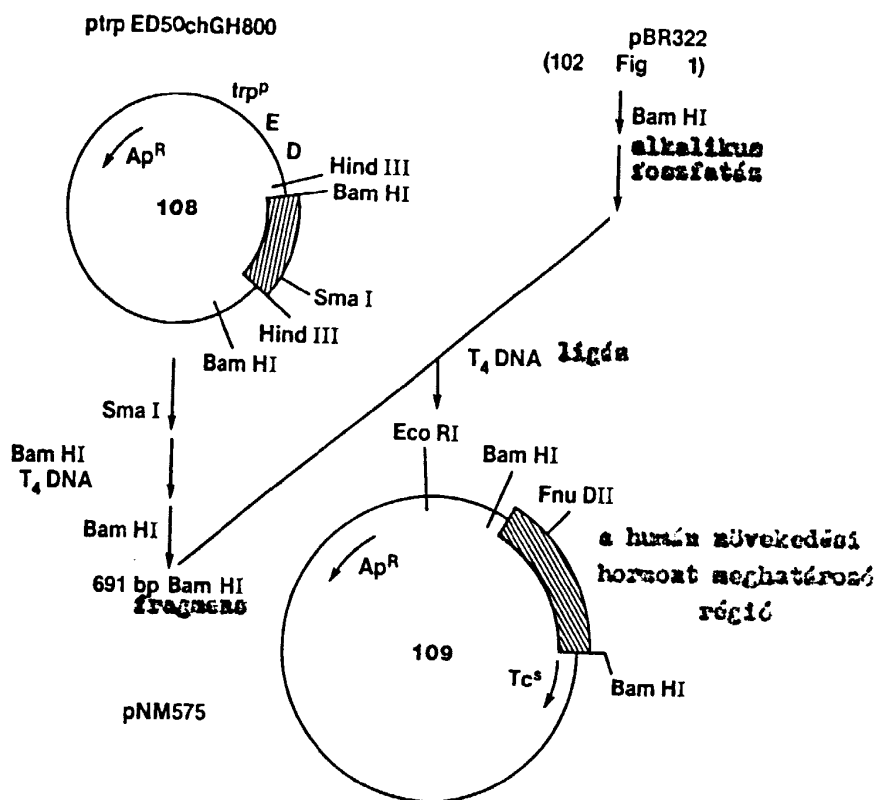
2. ábra



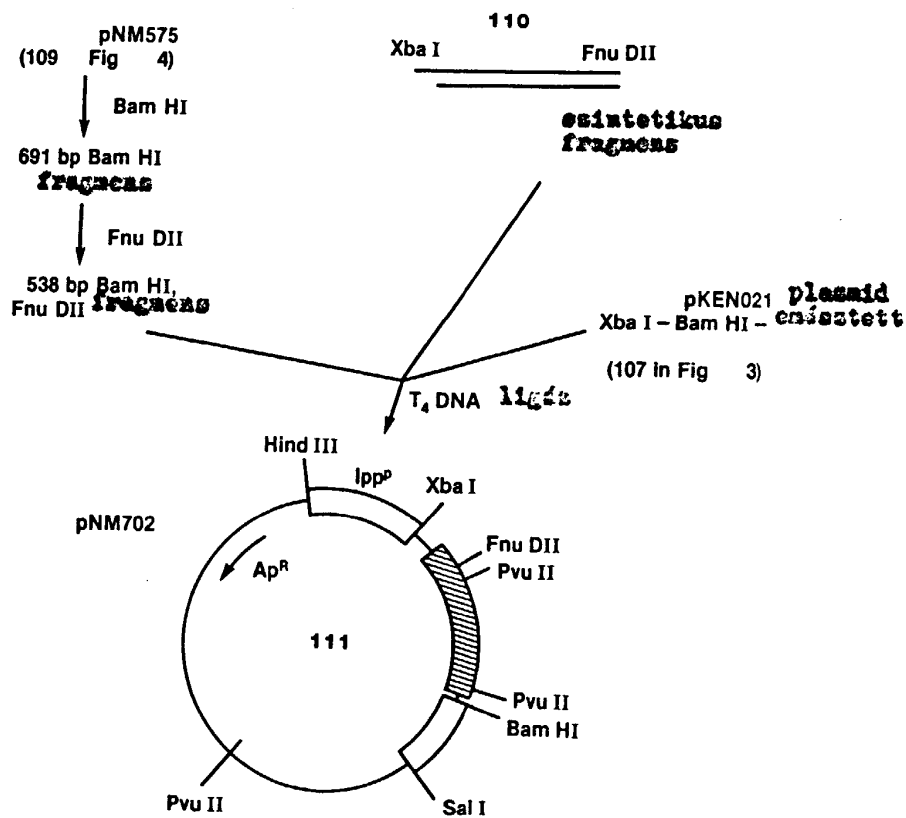
3. 4b2a



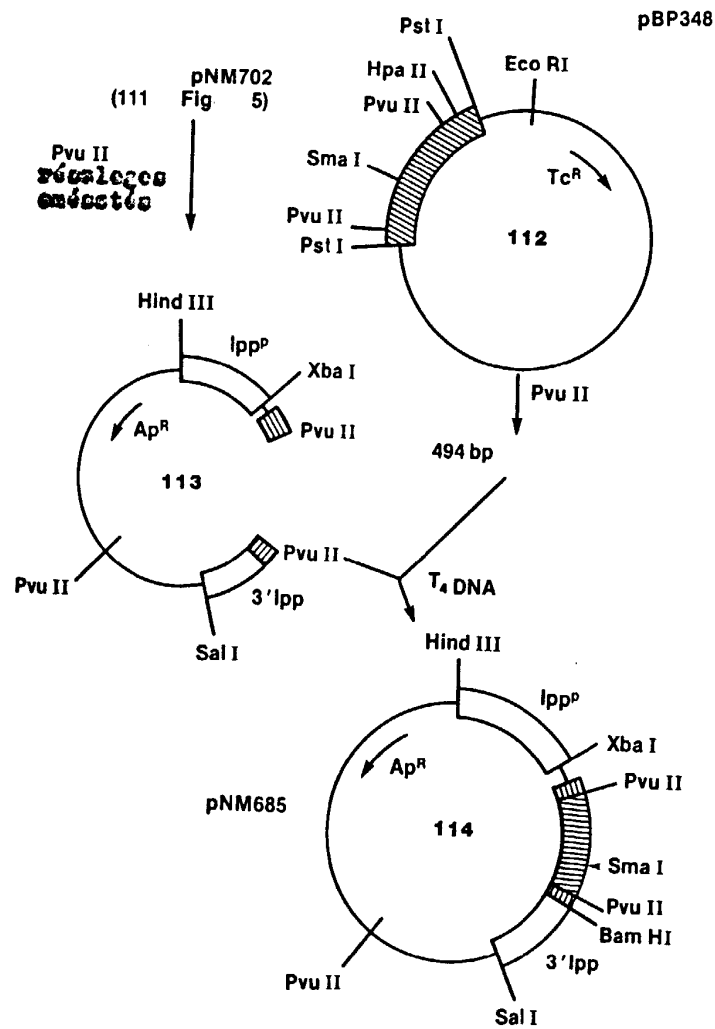
4. ábra



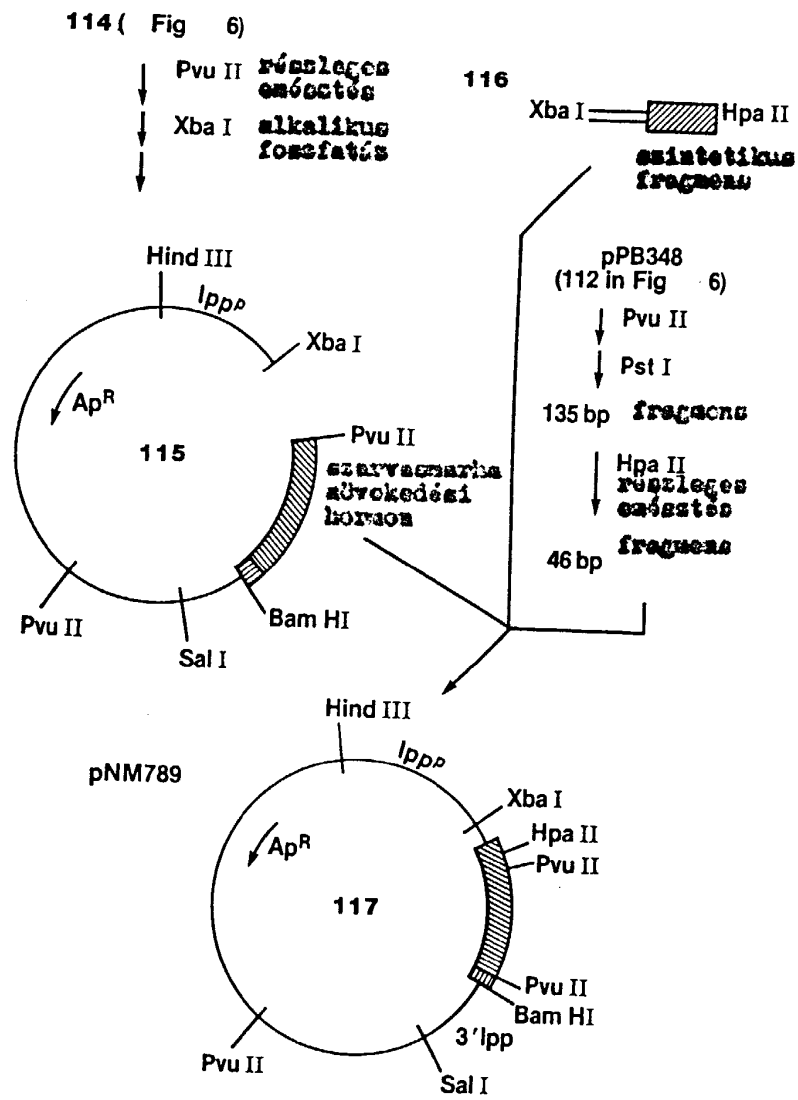
3. ábra



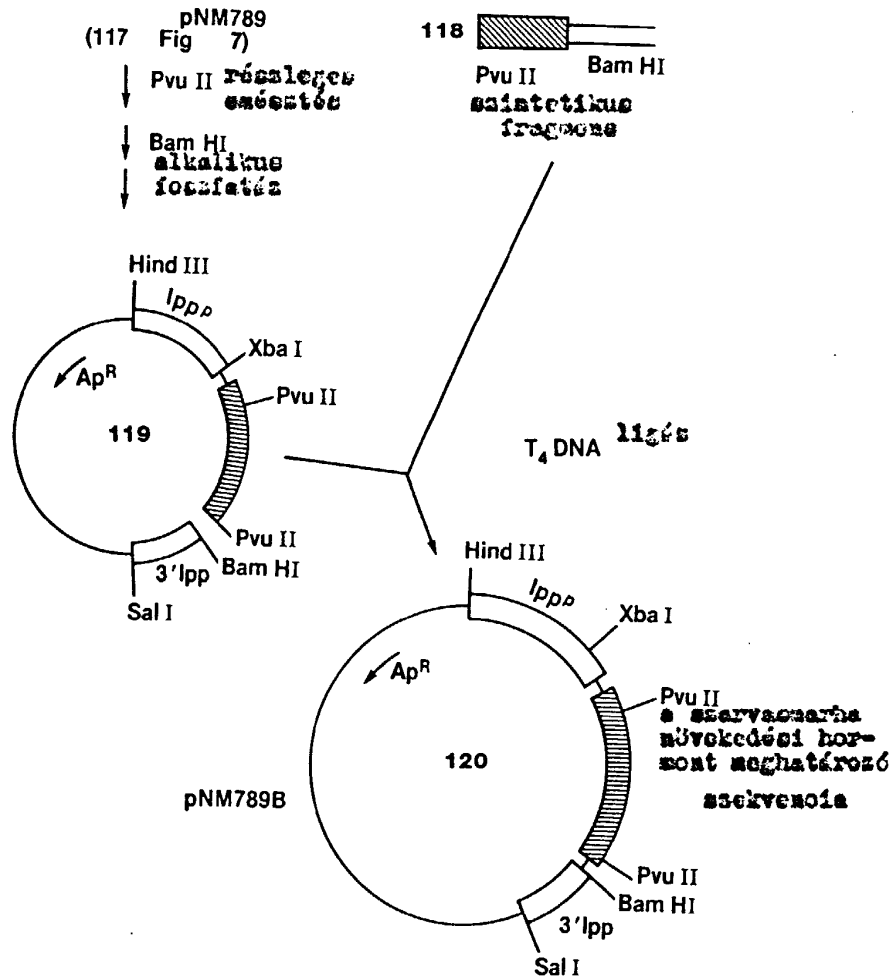
6. ábra



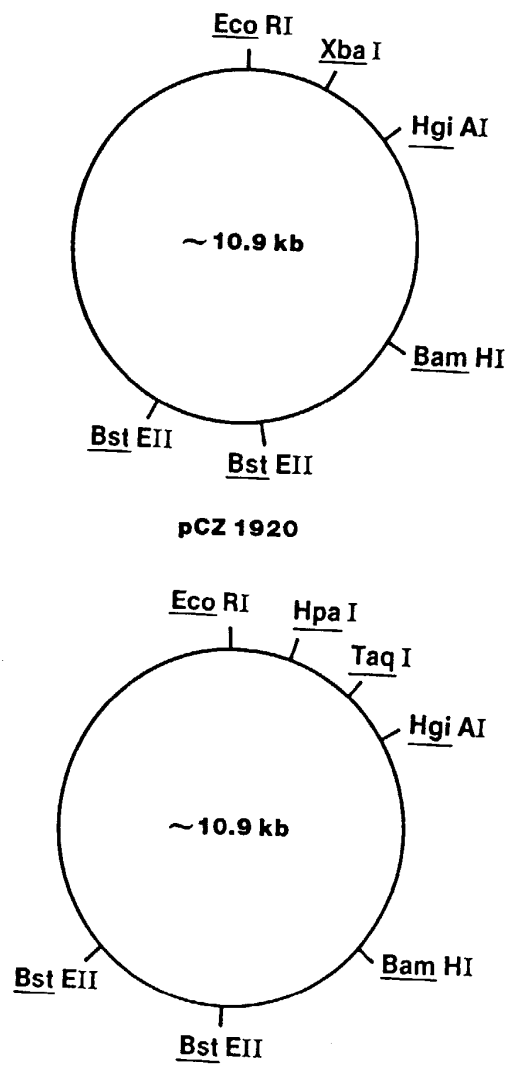
7. ábra



8. ábra

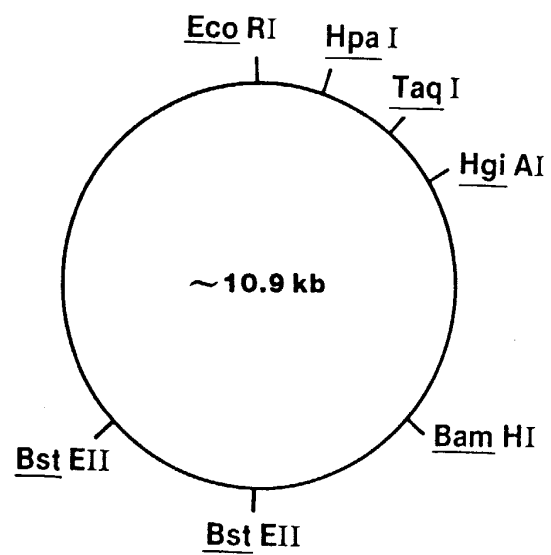


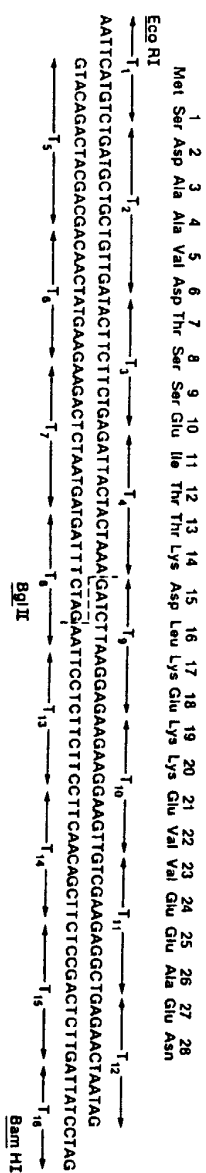
9. ábra



A pCZ112 plazmid restriktiozás térképe

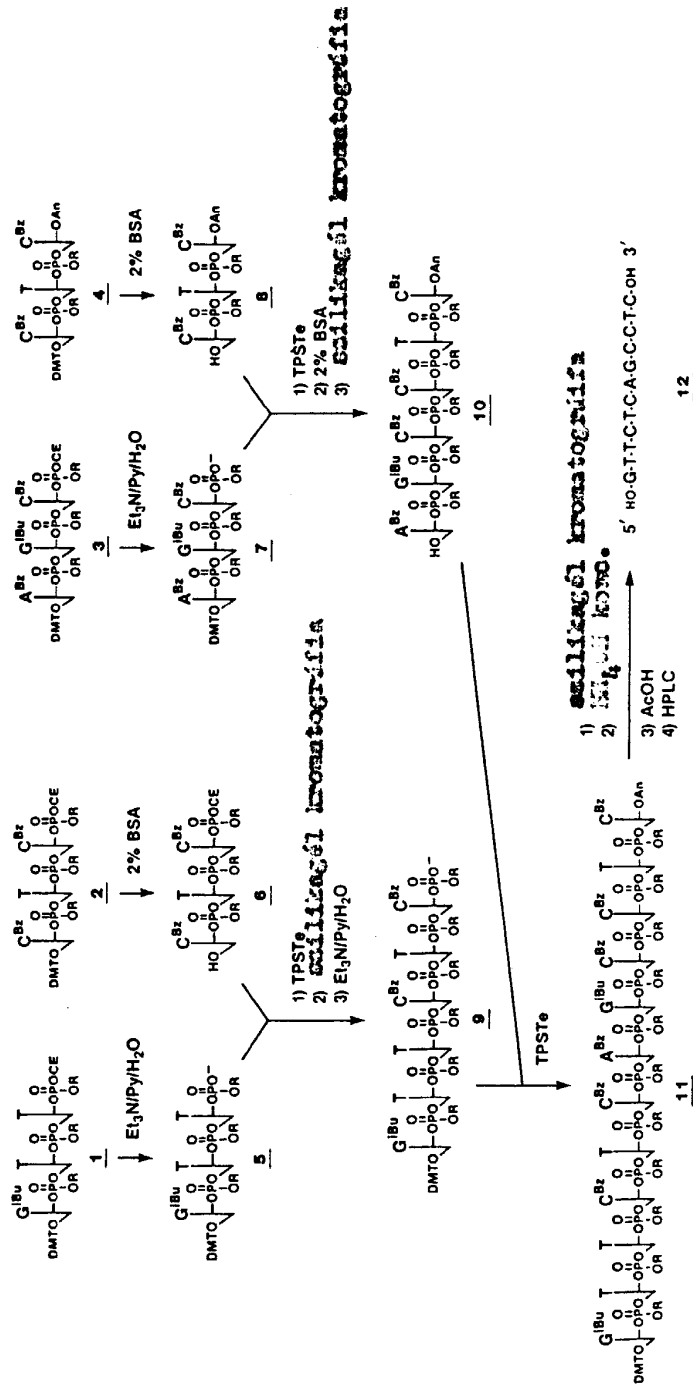
10. ábra



11. ~~11~~ 12. ~~12~~ 13. ~~13~~ 14. ~~14~~ 15. ~~15~~ 16. ~~16~~ 17. ~~17~~ 18. ~~18~~ 19. ~~19~~ 20. ~~20~~ 21. ~~21~~ 22. ~~22~~ 23. ~~23~~ 24. ~~24~~ 25. ~~25~~ 26. ~~26~~ 27. ~~27~~ 28. ~~28~~ 29. ~~29~~ 30. ~~30~~ 31. ~~31~~ 32. ~~32~~ 33. ~~33~~ 34. ~~34~~ 35. ~~35~~ 36. ~~36~~ 37. ~~37~~ 38. ~~38~~ 39. ~~39~~ 40. ~~40~~ 41. ~~41~~ 42. ~~42~~ 43. ~~43~~ 44. ~~44~~ 45. ~~45~~ 46. ~~46~~ 47. ~~47~~ 48. ~~48~~ 49. ~~49~~ 50. ~~50~~ 51. ~~51~~ 52. ~~52~~ 53. ~~53~~ 54. ~~54~~ 55. ~~55~~ 56. ~~56~~ 57. ~~57~~ 58. ~~58~~ 59. ~~59~~ 60. ~~60~~ 61. ~~61~~ 62. ~~62~~ 63. ~~63~~ 64. ~~64~~ 65. ~~65~~ 66. ~~66~~ 67. ~~67~~ 68. ~~68~~ 69. ~~69~~ 70. ~~70~~ 71. ~~71~~ 72. ~~72~~ 73. ~~73~~ 74. ~~74~~ 75. ~~75~~ 76. ~~76~~ 77. ~~77~~ 78. ~~78~~ 79. ~~79~~ 80. ~~80~~ 81. ~~81~~ 82. ~~82~~ 83. ~~83~~ 84. ~~84~~ 85. ~~85~~ 86. ~~86~~ 87. ~~87~~ 88. ~~88~~ 89. ~~89~~ 90. ~~90~~ 91. ~~91~~ 92. ~~92~~ 93. ~~93~~ 94. ~~94~~ 95. ~~95~~ 96. ~~96~~ 97. ~~97~~ 98. ~~98~~ 99. ~~99~~ 100. ~~100~~ 101. ~~101~~ 102. ~~102~~ 103. ~~103~~ 104. ~~104~~ 105. ~~105~~ 106. ~~106~~ 107. ~~107~~ 108. ~~108~~ 109. ~~109~~ 110. ~~110~~ 111. ~~111~~ 112. ~~112~~ 113. ~~113~~ 114. ~~114~~ 115. ~~115~~ 116. ~~116~~ 117. ~~117~~ 118. ~~118~~ 119. ~~119~~ 120. ~~120~~ 121. ~~121~~ 122. ~~122~~ 123. ~~123~~ 124. ~~124~~ 125. ~~125~~ 126. ~~126~~ 127. ~~127~~ 128. ~~128~~ 129. ~~129~~ 130. ~~130~~ 131. ~~131~~ 132. ~~132~~ 133. ~~133~~ 134. ~~134~~ 135. ~~135~~ 136. ~~136~~ 137. ~~137~~ 138. ~~138~~ 139. ~~139~~ 140. ~~140~~ 141. ~~141~~ 142. ~~142~~ 143. ~~143~~ 144. ~~144~~ 145. ~~145~~ 146. ~~146~~ 147. ~~147~~ 148. ~~148~~ 149. ~~149~~ 150. ~~150~~ 151. ~~151~~ 152. ~~152~~ 153. ~~153~~ 154. ~~154~~ 155. ~~155~~ 156. ~~156~~ 157. ~~157~~ 158. ~~158~~ 159. ~~159~~ 160. ~~160~~ 161. ~~161~~ 162. ~~162~~ 163. ~~163~~ 164. ~~164~~ 165. ~~165~~ 166. ~~166~~ 167. ~~167~~ 168. ~~168~~ 169. ~~169~~ 170. ~~170~~ 171. ~~171~~ 172. ~~172~~ 173. ~~173~~ 174. ~~174~~ 175. ~~175~~ 176. ~~176~~ 177. ~~177~~ 178. ~~178~~ 179. ~~179~~ 180. ~~180~~ 181. ~~181~~ 182. ~~182~~ 183. ~~183~~ 184. ~~184~~ 185. ~~185~~ 186. ~~186~~ 187. ~~187~~ 188. ~~188~~ 189. ~~189~~ 190. ~~190~~ 191. ~~191~~ 192. ~~192~~ 193. ~~193~~ 194. ~~194~~ 195. ~~195~~ 196. ~~196~~ 197. ~~197~~ 198. ~~198~~ 199. ~~199~~ 200. ~~200~~ 201. ~~201~~ 202. ~~202~~ 203. ~~203~~ 204. ~~204~~ 205. ~~205~~ 206. ~~206~~ 207. ~~207~~ 208. ~~208~~ 209. ~~209~~ 210. ~~210~~ 211. ~~211~~ 212. ~~212~~ 213. ~~213~~ 214. ~~214~~ 215. ~~215~~ 216. ~~216~~ 217. ~~217~~ 218. ~~218~~ 219. ~~219~~ 220. ~~220~~ 221. ~~221~~ 222. ~~222~~ 223. ~~223~~ 224. ~~224~~ 225. ~~225~~ 226. ~~226~~ 227. ~~227~~ 228. ~~228~~ 229. ~~229~~ 230. ~~230~~ 231. ~~231~~ 232. ~~232~~ 233. ~~233~~ 234. ~~234~~ 235. ~~235~~ 236. ~~236~~ 237. ~~237~~ 238. ~~238~~ 239. ~~239~~ 240. ~~240~~ 241. ~~241~~ 242. ~~242~~ 243. ~~243~~ 244. ~~244~~ 245. ~~245~~ 246. ~~246~~ 247. ~~247~~ 248. ~~248~~ 249. ~~249~~ 250. ~~250~~ 251. ~~251~~ 252. ~~252~~ 253. ~~253~~ 254. ~~254~~ 255. ~~255~~ 256. ~~256~~ 257. ~~257~~ 258. ~~258~~ 259. ~~259~~ 260. ~~260~~ 261. ~~261~~ 262. ~~262~~ 263. ~~263~~ 264. ~~264~~ 265. ~~265~~ 266. ~~266~~ 267. ~~267~~ 268. ~~268~~ 269. ~~269~~ 270. ~~270~~ 271. ~~271~~ 272. ~~272~~ 273. ~~273~~ 274. ~~274~~ 275. ~~275~~ 276. ~~276~~ 277. ~~277~~ 278. ~~278~~ 279. ~~279~~ 280. ~~280~~ 281. ~~281~~ 282. ~~282~~ 283. ~~283~~ 284. ~~284~~ 285. ~~285~~ 286. ~~286~~ 287. ~~287~~ 288. ~~288~~ 289. ~~289~~ 290. ~~290~~ 291. ~~291~~ 292. ~~292~~ 293. ~~293~~ 294. ~~294~~ 295. ~~295~~ 296. ~~296~~ 297. ~~297~~ 298. ~~298~~ 299. ~~299~~ 300. ~~300~~ 301. ~~301~~ 302. ~~302~~ 303. ~~303~~ 304. ~~304~~ 305. ~~305~~ 306. ~~306~~ 307. ~~307~~ 308. ~~308~~ 309. ~~309~~ 310. ~~310~~ 311. ~~311~~ 312. ~~312~~ 313. ~~313~~ 314. ~~314~~ 315. ~~315~~ 316.

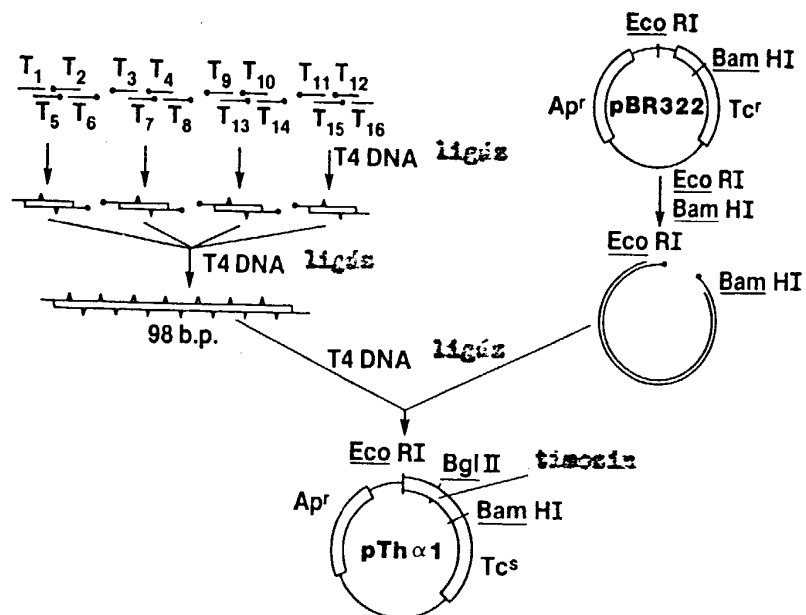
A T₁₅ fragmentus szintézise

12. lépés



A pThalfat elöállítás

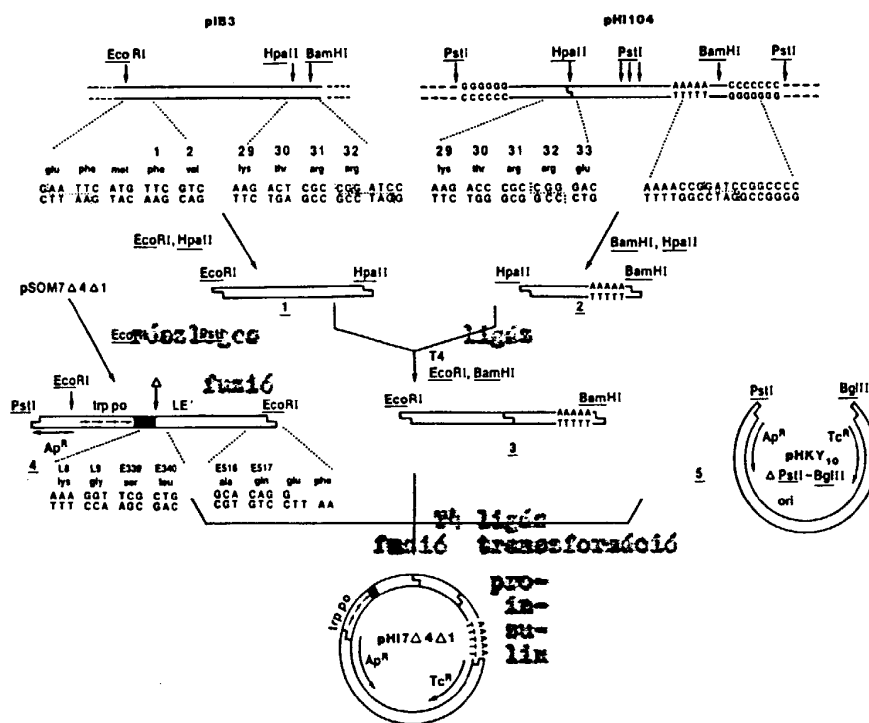
13. ábra



14. Case

1-3) **szilveszter a B, a 31-65 a C és a 66-86 dormánunk és a láncot alkotják.**

A p~~HE~~7 Δ ⁴ Δ ¹ plasmid el5411422
15. 4hrs



A pHI104 plazmid előállítás

16. ábra

