

2J77/89
**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

10225/90
ELJÁRÁS hEGF ELŐÁLLÍTÁSÁRA

52552--

Nippon Shinyaku Co. Ltd., Minami-ku, Kyoto, JAPÁN

A bejelentés napja: 1989.07.14.

Elsőbbsége: 1988.07.15. (63/177 685) JAPÁN

K I V O N A T

A találmány tárgya genetikai manipulációs technikai eljárás hEGF előállítására egy hEGF-et kódoló génnek valamely vektorba iktatásával, E.coli gazdaszervezetnek transzformálásával ezen vektorral, az így kapott transzformáns tenyésztésével, és a kapott hEGF-nek a tenyészközegből való kinyerésével és összegyűjtésével. Az eljárást az jellemzi, hogy egy triptofán (trp) operonhoz szolgáló promotor gént és E.coli alkálikus foszfátáz génhez szolgáló szignál peptidet kódoló gént integrálnak egy hEGF génbe a "fölfelé" levő területben, és folyamatosan két terminációs kodont és egy transzkripció terminátort integrálnak a "lefelé" levő területben.

67365-3118-GI

3577/89

10000/90

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

52552--
A

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI IRODA

NS205

C12N N/19

C12N N/71

ELJÁRÁS HEGF ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Nippon Shinyaku Co. Ltd., Minami-ku, Kyoto, JAPÁN

Feltalálók: YANO Junichi, Nara

MURAI Masatoshi, Ashiya, JAPÁN

A bejelentés napja: 1989.07.14.

Elsőbbsége: 1988.07.15. (63/177 685) JAPÁN

67365-3118-GI

A jelen találmány tárgya eljárás humán epidermális növekedési faktor (hEGF) előállítására, hatékonyan alkalmazva a genetikai manipulációs technikákat.

Itt szeretnénk tisztázni, hogy a hEGF ugyanaz a vegyület, mint a β -urogasztron. A jelen találmány olyan hEGF-et, amely gyógyszerként, pl. fekélyellenes szerként, stb. alkalmas, nyújt nagy léptékben egyszerű módon.

A genetikai manipulációs technikák az alábbi (1)-(4) eljárási lépések kivitelezésére már ismertek: (1) egy adott vegyületet kódoló gén integrálása valamely vektorba, (2) E.coli gazdaszervezet transzformálása ezt a vektort alkalmazva, (3) az így kapott transzformáns tenyésztése, és (4) az adott vegyület kinyerése és összegyűjtése a tenyészoldatból. Különböző berendezéseket állítottak elő, hogy kinyerjék az e szerint a technika szerint kapott nyomnyi fehérjét, amely hasznos az emberiség számára. Részleteket írnak le ezzel kapcsolatban az alábbi irodalmi helyeken:

Tacon W., Carey N., Emetage S.: Molec. Gen. Genet. 177, 427 (1980),

Tacon W. és munkatársai: Gene 23, 255 (1983).

Kawai S. és munkatársai: J. Ferment. Technol. 64, 503 (1986).

Oka T. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212 (1985), stb.

A legutóbbi technika szerint olyan eljárást ismertetnek, amely magában foglalja egy rekombináns DNS megalkotását, amely hordoz mind egy E.coli alkálikus foszfatáz gén eredetű promotort, mind egy ennek szabályozása alatt levő szignál peptidet, továbbá amely DNS-be egy hEGF-et kódoló gén van integrálva, hogy végülis hEGF-et kapjanak (003799/89 és 003800/89. számú nem vizsgált japán közzétételi irat). Ebben az eljárásban a kitermelés fokozása érdekében különböző találmányok vannak bevezetve az inkubálás során, pl. tenyésztés alacsony hőmérsékletű zónában a fehérje-szintézis képesség indukálása előtt és magas hőmérsékletű zónában a fehérje-szintézis képesség indukálása után; vagy tenyésztés enyhén savas vagy semleges körülmények között a fehérje-szintézis képesség indukálása előtt, míg tenyésztés gyengén lúgos körülmények között a fehérje szintézis képesség indukálása után. Ezen találmányok segítségével jó eredményeket értek el.

A technika eddigi állása szerint, amelyet fentebb leírtunk, a szóban forgó hEGF-et bizonyos esetekben valóban magas kitermeléssel állíthatjuk elő. Abban az esetben azonban, ha nagy sűrűségű tenyészetet kívánunk alkalmazni azzal a feltétellel, hogy a termék a tápközegbe fejeződjék és választódjék ki, a technika jelenlegi állása szerinti eljárások több hiányosságot mutatnak. Ilyen hiányosságok pl. az alábbiak:

(1): a technika állása szerinti eljárásokban nem lehet

szabadon szabályozni azt az időt, amikor a transzformált E.coli elkezd termelni a hEGF-et; (2): ebből az okból nem lehet megfelelően szaporítani a transzformált E.colit a hEGF-termelés megkezdése előtt; és (3): ennek következtében a transzformált E.colinál nem lehetséges a hEGF-termelés előrehaladásának szabályozása az úgynevezett nagy sűrűségű tenyészetekben (ez olyan E.coli tenyészetekre vonatkozik, amelyekben az OD₅₅₀ érték 40-nél több).

Ezen az alapon nem lehetséges alkalmazni a rátáplálásos (fed-batch) rendszert (folyamatos tenyésztési technika, amelyben a tenyésztés folyamán a tápközeget kiegészítik), amely pedig alapvetően szükséges a nagy sűrűségű tenyészetek kialakításához.

A jelen találmány feltalálójának kísérletei olyan irányzatot tártak fel, amely szerint a transzformált E.coli szaporodása gátolt lesz, amikor ez a transzformált E.coli elkezd termelni a hEGF-et. Bár ennek oka nem világos, feltételezhető, hogy jelentős stresszhatás alakul ki a transzformált E.colira nézve azt a hEGF-re fajlagos jelenséget figyelembe véve, hogy ez a termelt hEGF nem marad a transzformált E.coli citoplazmájában, sem a periplazmában (a belső membrán és külső membrán között), hanem kiválasztódik a sejten kívülre. Erre a jelenségre alapozva tételezhető fel, hogy a transzformált E.coli szaporodása akkor kezd el gátlódni, amikor a hEGF elkezd termelődni.

Az előzőekből következik, hogy nagy sűrűségű tenyészet létrehozása céljából a hEGF termelését csak akkor szükséges beindítani, amikor a transzformált E.coli már megfelelően elszaporodott; ebből a célból szükséges a hEGF termelés szabad időbeli szabályozásának biztosítása.

A jelen találmány lényege az alábbiakban foglalható össze.

- (1) Promotorként triptofán (trp) operonhoz szükséges promotort kódoló gént alkalmazunk.
- (2) 3-indol-akrilsav (IAA) hozzáadásával szabályozzuk azt az időtartamot, amikor a transzformált E.coli hEGF-et termel.
- (3) A tenyészetben hatékonyan alkalmazzuk a rátáplálásos rendszert, amelyben valamely tápközeg kiegészítésének sebessége változó lehet.
- (4) A tápközeg kiegészítéséhez alkalmazott szénforrás glükóz, glicerín, vagy glükóz és glicerín kombinációja.
- (5) A fenti (4) rátáplálásos rendszerben továbbá először glükózt, majd glicerint alkalmazunk szénforrásként a rátáplálásos rendszerben levő tápközeg kiegészítésére.

Ezután a fenti pontok eljárásait részletesen ismertetjük.

Amikor promotorként E.coli alkálikus foszfatáz gén eredetű promotort alkalmazunk, a hEGF termelőkéesség leáll a foszfát jelenléte miatt a tápközegben. A transzformált E.coli szaporodik és a szaporodás folyamán a foszfát fogy és olyan kis mennyiségűvé csökken, amely már egy meghatározott koncentráció alatt van. Ezután az E.coli alkálikus foszfatáz gén-eredetű promotor működésbe lép, hogy beindítsa a hEGF termelést. Ebben a technika állása szerinti folyamatban a munkamenet közbeni tüneteket a tenyészcoldat a pH-jának és hőmérsékletének ellenőrzésével szabályozzuk és ilyen módon fokozzuk a hEGF-re vonatkozó termelékenységet.

A jelen találmányban a fentebb említett trp-promotort alkalmazzuk a fentebb leírt E.coli alkálikus foszfatáz gén-eredetű promotor helyett.

A jelen találmányban előzetesen 50 mg/l triptofánt adunk a tápközeghez. Miközben a transzformált E.coli szaporodik, a triptofán fogy; amikor a triptofán mennyisége egy meghatározott koncentráció alá csökken, a trp operon promotora működésbe lép, hogy beindítsa a hEGF termelést. Amikor azonban a triptofán megfelelő mennyiségben van jelen a tápközegben, nincs esély arra, hogy a jelen találmány szerinti promotor beindítsa a hEGF termelést. Ezen kívül, amint ezt később a példánál bemutatjuk, főleg a transzformált E.coli olyan tulajdonságokkal bír, hogy amikor ez hEGF-et választ ki, szaporodási sebessége gyengül vagy szaporodása megszakad.

Ezekből a tényekből arra jöttünk rá, hogy a jelen találmányban alkalmazott trp promotart hordozó kiválasztó kifejező plazmid vektor különösen alkalmas arra, hogy hasznosuljon transzformált E.coli később leírt nagy sűrűségénél, mivel ennek kifejeződését könnyen lehet szigorúan szabályozni. Következésképpen abból a célból, hogy a kiválasztott hEGF kiválasztási mennyiségét több, mint 150 mg/l-re növeljük, triptofán jelenlétében hajtunk végre inkubálást; amikor a transzformált E.coli megfelelően nagy sűrűségűvé felszaporodik, azonnal IAA-t adunk hozzá és a terméket rövid idő alatt kinyerhetjük (10-18 óra).

Ezen kívül glicerín hozzáadásával glükóz helyett a rátáplálásos rendszerben, vagy a glükóz felváltásával glicerínre az adagolás során elegáns módon válik lehetségessé az időzítés a trp promotor működésének beindításához, amint ezt később leírjuk.

Az IAA olyan vegyület, amelynek szerkezeti hasonlósága van a triptofánhoz, és amely erősebb affinitással bír a represszor fehérjéhez, mint a triptofán. Ennek következtében az IAA jelentős erővel kötődik a represszorhoz, és így megakadályozza, hogy a represszor a promotorhoz (operátorhoz) kötődjék. Ennél fogva ha IAA-t a tápközeg részévé tesszük, ez a promotor éppen akkor lép működésbe, amikor triptofán van jelen a tápközegben.

Az előzőekből világosan megérthető, hogy a hEGF termelését IAA hozzáadásával indíthatjuk be a jelen találmány szerint a tenyésztés bármelyik stádiumában. A jelen találmány legfontosabb vonása ebben a pontban van.

Ismeretes, hogy amikor a transzformált E.coli szaporodása fokozódik, arányosan fokozódik az ezzel együtt járó hEGF termelés is. A transzformált E.coli sűrűségét a tápközegben úgy lehet fokozni, hogy erre a célra speciális tápközeget tervezünk, vagy a rátáplálásos rendszert alkalmazzuk. Ennél fogva ha a hEGF termelést csak a transzformált E.coli szaporítása után fokozzuk, a hEGF-et nagyon hatékonyan nyerhetjük ki.

A jelen találmányban az általános genetikai manipulációs technikában hagyományosan alkalmazott eljárásokat alkalmazhatjuk megfelelő módon. Így pl. E.coli gazdasejtként valamely E.coli K12 törzs, ez a széles körben alkalmazott törzs, alkalmazható. Ezen kívül vektorként kereskedelmi forgalomban található plazmidokat kombinálhatunk ismert genetikai manipulációs technikák szerint. Pontosabban az alábbi E.coli törzseket alkalmazhatjuk a jelen találmány szerinti eljárásokban:

JM101, TB1, HB101, RR1, DH1, MM294, C600 galK⁻, Y1090 (pMC9-hiányos törzs).

Alkalmazhatók ezen kívül mindezen törzsek különböző

származékai is.

A jelen találmányban pl. az alábbi plazmidok és fágok alkalmazhatók:

pDR540 (gyártja a Pharmacia Fine Chemicals Inc.), ml3mpl8 és mpl9 (gyártja a Takara Shuzo Co., Ltd.).

A jelen találmányban pl. az alábbi tápközegeket alkalmazhatjuk alaptápközegként és kiegészítő tápközegként:

LB tápközeg (10 g/l Bacto-tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 5 g/l nátrium-klorid);

M9 tápközeg (6 g/l dinátrium-hidrogén-foszfát, 3 g/l kálium-dihidrogén-foszfát, 0,5 g/l nátrium-klorid, ammóniumklorid, 2 mmól/l magnézium-szulfát, 0,1 mmól/l kalciumklorid);

4YTM9 tápközeg (M9 tápközeg az alábbi komponensekkel kiegészítve: 32 g/l Bacto-tripton, 20 g/l élesztőkivonat).

A tápközeget agar hozzáadásával állíthatjuk elő a lemeztáptalajok esetében 1,5% koncentrációban, míg M13 fág felső réteg tápközeg esetében 0,6% koncentrációban. A valamely plazmidot tartalmazó E.coli tenyésztése esetén ampicillint adunk a tápközeghez 100 mg/l koncentrációban, hogy a plazmidokat megvédjük az elvesztéstől.

A jelen találmány szerinti eljárásban olyan restrikciós enzimeket és DNS-t módosító enzimeket alkalmazhatunk, amelyek általában használatosak a szokásos genetikai manipulációs technikákban. Alkalmazhatjuk pl. a Takara Shuzo Co.; Ltd., Toyobo Co., Ltd.; Pharmacia Fine Chemicals Inc.; és a Boehringer Mannheim cégek által gyártott enzimeket. A jelen találmány szerinti eljárásban ezeket az enzimeket az ismert közleményekkel és kézikönyvekkel összhangban alkalmazhatjuk (pl.: Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York).

Az E.coli transzformálásánál, a plazmid tisztításánál és a fág DNS tisztításánál a jelen találmány eljárása során olyan technikákat alkalmazhatunk, amelyeket a genetikai manipulációkban általában használnak. Ezzel kapcsolatban követhetjük az ismert kézikönyveket és közleményeket (pl. a korábban említett Molecular Cloning ... c. kézikönyvet).

A jelen találmány szerinti oligonukleotidokat olyan megfelelő technikákat alkalmazva szintetizálhatjuk, amelyeket általában alkalmaznak a szokásos DNS szintézisben (pl. triészter eljárás). Másrészt az oligonukleotidokat szintetizálhatjuk a kereskedelmi forgalomban kapható DNS szintetizáló berendezéseken is (pl. Model 380B, amely az Applied Biosystem Inc. gyártmánya).

Az oligonukleotidok ligálásához a jelen találmányban olyan technikákat alkalmazhatunk, amelyeket hagyományosan használnak a genetikai manipulációs technikában. Így pl. 1-1 g szintetikus oligonukleotidot foszforilezünk 20 l kapcsoló kináz pufferban (lásd Molecular Cloning ...), majd összekeverjük ezeket. 70°C hőmérsékleten 10 percen át végzett melegítés után a rendszert fokozatosan szobahőmérsékletre hűtjük le mintegy 1 óra alatt. Ezután azonos térfogatú, egyszeres koncentrációjú kapcsoló kináz puffert adunk a keverékhez és T4 DNS ligázt adunk hozzá. A keveréket egy éjszakán át állni hagyjuk 16°C hőmérsékleten. Ezután a keveréket 10 percen át 70°C hőmérsékleten melegítjük, hogy inaktiváljuk a T4 DNS ligázt. Ezután a puffert kicseréljük az etanol-kicsapásos eljárással. Miután restriktációs enzimekkel hasítottunk mindkét végen úgy, hogy a szóban forgó fragmentum képződjék, frakcionálást hajtunk végre 8% poliakrilamid lemez gélelektroforézissel. A szóban forgó DNS fragmentumot tartalmazó gélből a DNS-t pufferral végzett extrahálással tisztítjuk (lásd: Molecular Cloning ...). Ez a technika az oligonukleotidok ligálásának tipikus példája a jelen találmányban.

Abból a célból, hogy meghatározzuk a hGEF, amely a szóban forgó termék a jelen találmányban, mennyiségét a genetikai manipulációs technikákban szokásos technikákat alkalmazhatjuk. Pontosabban a hGEF mennyiségét radioimmunassayval határozhatjuk meg (pl. az Amersham által készített készletet alkalmazva, standardként a kereskedelmi forgalomban levő

hEGF-et alkalmazva (amely pl. a Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd, vagy az Amersham Inc. készítménye).

Az alábbiakban megadjuk az ábrák rövid leírását.

Az 1. ábra a jelen találmány szerinti trp promotor szekvenciáját mutatja be, valamint az SD szekvenciát és az E.coli alkálikus foszfatáz szignál peptid gént.

A 2. ábra a jelen találmány szerint hEGF gén szekvenciáját mutatja be.

A 3. ábra a jelen találmány szerinti kiválasztó kifejező plazmid előállításának munkamenetét ábrázolja.

A 4. ábra a jelen találmány szerinti pBT23 kiválasztó kifejező plazmid HindIII-BamHI fragmentum szekvenciáját mutatja be.

Az 5. ábra az 1. példa eredményeit mutatja be, ahol az abszcissza a tenyésztés idejét jelenti (órában), és a függőleges tengely a hEGF mennyiségét jelenti (mg/literben) a tápközegben: ● jelenti a fermentorban kapott eredményeket és ■ jelenti a lombikban kapott eredményeket.

A 6. ábra a 2. példa eredményeit mutatja be, ahol az abszcissza a tenyésztés idejét jelenti (órában), és a függőleges tengely a hEGF mennyiségét jelenti (mg/literben)

a tápközegben: ● jelenti a fermentorban kapott eredményeket és ■ jelenti a lombikban kapott eredményeket.

A 7. ábra a 3. példa eredményeit mutatja be, ahol az abszcissza a tenyésztés idejét jelenti (órában) és a függőleges tengely a hEGF (mg/literben) és a sejt (OD₅₅₀-ben kifejezve) mennyiségét jelenti: ○ jelenti a sejtmennyiséget és ● jelenti a hEGF termelést.

A 8. ábra a 4. példa eredményét mutatja be, ahol az abszcissza a tenyésztés idejét jelenti (órában) és a függőleges tengely a hEGF (mg/literben) és a sejt (OD₅₅₀-ben kifejezve) mennyiségét jelenti: ○ jelenti a sejtmennyiséget és ● jelenti a hEGF termelést.

Ezután a jelen találmányt részletesen ismertetjük az itt követhető referencia példák és kiviteli példák segítségével.

1. referencia példa

Kiválasztó kifejező plazmid előállítása

(1) trp promotor, SD szekvencia és E.coli alkálikus foszfatáz szignál peptid gén szintézise.

A trp promotor és a használt SD szekvencia (Shine-Dalgarno riboszóma kötőhely) a -60. helynél levő T-től a +26. helynél levő A-ig helyezkedik el, amikor a transzkripció iniciációs helynél levő A-t nevezzük +1-

nek. A -60. helynél levő T 5'-végnél HindIII hasítási helyet szolgáltatunk, számításba veendő ezt a helyet valamely vektorral való ligáláshoz. Az E.coli alkálikus foszfatáz szignál peptid gén a természetben előforduló szekvenciát követi, de számításba véve a vektorral való ligálást és a hEGF génnel való ligálást, a GTG iniciációs kodon ATG-re van módosítva, a C-terminálisnál a GCT GCG-re van módosítva, és a 3'-végen EcoRI hasítási hely van biztosítva. A most említett szekvenciát 8 oligonukleotidra osztva szintetizáljuk, amelyeket azután hagyományos módon ligálunk. A terméket HindIII-EcoRI DNS fragmentumként tisztítjuk. Ezután ezt a fragmentumot beiktatjuk az M13mpl8 fág replikatív formájú DNS HindIII-EcoRI hasítási helyei közé, és ennek nukleotid-szekvenciáját a didezoxi szekvenciaelemzési eljárással igazoljuk (1. ábra).

(2) A hEGF gén szintézise.

A hEGF gén szekvenciáját a természetes hEGF aminosavszekvenciájára alapozva tervezzük meg. A szekvencia kiötlésében az alábbi három pontot vesszük figyelembe: olyan kodon alkalmazása, amely nagy gyakorisággal hasznosul E.coliban; az olyan ismétlődő szekvencia eltávolítása, amely szekunder szerkezetet alakít ki; és gondoskodás a SphI hasítási helyről a gén ligálásához szükséges gén közepén.

Pontosabban a hEGF gént egy 21 oligonukleotidból

összeállított EcoRI-SacI DNS fragmentumként állítjuk elő.

Először az EcoRI-SacI DNS fragmentum első részét alkotó 11 oligonukleotidot szintetizáljuk és ligáljuk hagyományos módon, amelyet azután beiktatunk az M13mpl8 fág replikatív formájú DNS EcoRI-SphI hasítási helyei közé. A nukleotid-szekvenciát a didezoxi szekvenciaelemzési eljárással igazoljuk.

Ezután az SphI-SacI DNS fragmentum hátsó részét alkotó 10 oligonukleotidot szintetizáljuk és ligáljuk hagyományos módon, amelyet azután beiktatunk az M13mpl8 fág replikatív formájú DNS SphI-SphI hasítási helyei közé. A nukleotid-szekvenciát a didezoxi szekvenciaelemzési eljárással igazoljuk.

A megfelelő rekombináns M13 fág replikatív formájú DNS-ből az EcoRI-SphI DNS fragmentumot illetve SphI-SacI DNS fragmentumot kimetsszük és egymással ligáljuk, hogy megkapjuk a hEGF gént.

A teljessé egészített hEGF génben az 5'-vég alkotja az EcoRI hasítási helyet és ez a rész az N-terminális aminosav aszparaginjának felel meg. 3'-vége alkotja a SacI hasítási helyet és ez olyan formában van, hogy a TGA és TAG terminációs kodonok kövessék ezt közvetlenül. A ligált hEGF EcoRI-SacI DNS fragmentumot beiktatjuk az

M13mpl8 fág replikatív formájú DNS EcoRI-SacI hasítási helyébe. A nukleotid-szekvenciát ismét igazoljuk a didezoxi szekvenciaelemzési eljárással (2. ábra).

(3) A kiválasztó kifejező plazmid előállítás.

Először a pDR540 (gyártja a Pharmacia Fine Chemicals Inc.) EcoRI hasítási helyét töröljük hagyományos módon, DNS polimeráz Klenow-fragmentumot és T4 ligázt alkalmazva; így alkotjuk meg a pDR540E⁻ plazmidot.

Ezután hagyományos módon szintetizált és ligált kapcsolót (linkert) iktatunk be ennek a pDR540E⁻ DNS-nek a BamHI hasítási helyébe, ilyen módon EcoRI, XhoI, SacI és PvuII hasítási helyeket vezetünk újonnan bele.

Ezen kívül trpA terminátor szekvenciát (gyártó: Pharmacia Fine Chemicals Inc.) iktatunk be ebbe a PvuII hasítási helybe, hogy a pATGt plazmidot előállítsuk. A szintetikus hEGF gént tartalmazó EcoRI-SacI DNS fragmentumot ennek a pATGt plazmid DNS-nek az EcoRI hasítási helye és SacI hasítási helye közé iktatjuk be, hogy előállítsuk a pBT19 plazmidot.

Ezután a trp promotort, SD szekvenciát és E.coli alkálikus foszfatáz szignál peptid gént tartalmazó HindIII-EcoRI DNS fragmentumot beiktatjuk a pBT19 HindIII hasítási helye és EcoRI hasítási helye közé, így alkotva meg a pBT23 hEGF kiválasztó kifejező plazmidot

(3. és 4. ábra).

2. referencia-példa

hEGF kifejezése és ennek eloszlása.

A pBT23-at tartalmazó C600galK⁻ törzset rázott tenyészetben tenyésztjük, 0,1 liter térfogatban, LB tápközegben egy éjszakán át, ez képezi az előtenyészetet. Az előtenyészetből 4 ml-t (2%-os inokulálási arány) inokulálunk 0,2 liter M9 tápközegbe [amely 5 g/l kazamino-savat (savval hidrolizált kazein), 2 g/l glükózt, 10 mg/l B₁ vitamint és 100 mg/l ampicillint tartalmaz], amely 0,5 liter térfogatú rázólabdikba van betöltve, ezután a tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 125/perc fordulattal. Az exponenciális növekedési fázisnál (ebben az esetben az OD₅₅₀ mintegy 0,1) 3-indol-akrilsavat (IAA) adunk a tenyészethez 20 mg/l koncentrációban, hogy indukáljuk a trp promotort. A tenyészet beindításától számítva 1; 2; 4; 6; 8; és 24 óra múlva mintát veszünk és centrifugáljuk ezt, hogy elkülönítsük egymástól a tápközeget és a sejteket. A sejtekből tovább szeparáljuk a periplazmás frakciót az ozmotikus sokk módszerével. A hEGF mennyiségét a tápközegben és a periplazmában radioimmunassayval határozzuk meg (az ehhez szolgáló készlet az Amersham Inc. gyártmánya). Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. TÁBLÁZAT: A hEGF eloszlása

A tenyészet kora (óra)	A hEGF mennyisége (mg/l)	
	<u>Periplazma</u>	<u>Tápközeg</u>
1	0,011	0,017
2	0,016	0,030
4	0,022	0,190
6	0,017	0,430
8	0,014	0,490
24	0,004	0,730

A tápközegben elért maximális hEGF mennyiség 0,73 mg/l, 24 órával a tenyészet beindítása után. A periplazmában felgyülemlett hEGF a maximumot 4 órával a tenyészet beindítása után éri el, de ez a maximum csak mintegy 0,02 mg/l. Ezután a hEGF csökken, és 24 óra után csaknem eltűnik.

Ezekből a tényekből beigazolódik, hogy a kiválasztott hEGF zömmel a tápközegben van jelen. Így a későbbi munkamenetekben a termelődött hEGF mennyiségét csak a tápközegben mérjük.

3. referencia példa

Tanulmány az E.coli gazdasejtekről.

A pBT23 DNS-t alkalmazva E.coli HB101, RR1, DH1, MM294, Y1090 (pMC9-hiányos törzs), JM101 és TB1 törzseket transzformálunk, hogy megfelelő, pBT23-at tartalmazó E.coli

transzformánsokat kapjunk.

A transzformánsokat a 2. referencia példában leírt körülmények között tenyésztjük, a C600galK⁻ transzformánssal is elvégezve a tenyésztést. A trp promotor indukcióját IAA-val 9,5 órával azután végezzük el, miután a tenyésztést elindítottuk. Ebben az időpontban és 24 óra után mérjük a hEGF mennyiségét (2. táblázat)

2. TÁBLÁZAT. A hEGF mennyisége különböző E.coli transzformánsokban

<u>E.coli törzs</u>	<u>hEGF mennyisége (mg/l)</u>	
	<u>9,5 óra múlva</u>	<u>24 óra múlva</u>
C600galK ⁻	0,54	1,25
HB101	0,54	1,25
RR1	1,23	0,93
DH1	0,64	0,45
MM294	0,28	0,50
Y1090(pMC9-hiányos törzs)	0,03	0,02
JM101	0,81	0,67
TB1	2,30	4,00

A nyolc E.coli transzformáns közül a TB1 szolgáltatja a legnagyobb termelési eredményt, ez eléri a 4 mg/litert. Ez után a C600galK⁻ és a HB101 nyújtják a második legnagyobb eredményt, mindkettő eléri az 1,25 mg/litert. Ezeket a törzseket úgy tekintjük, hogy alkalmasak hEGF előállítására.

4. referencia példa.

Tanulmány a trp promotor indukciójának időzítéséről. pBT23-at tartalmazó HB101 transzformánst alkalmazva tenyésztést végzünk ugyanolyan körülmények között, mint a 2. referencia példában. Az IAA-t 20 mg/l koncentrációban adjuk az exponenciális növekedési fázis átmeneti és késői stádiumában és a stacionárius stádiumban, és megvizsgáljuk a hEGF mennyiségét a tápközegben. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. TÁBLÁZAT. A trp promotor indukálásának időzítése és a hEGF termelés

A hEGF mennyisége (mg/l)			
A tenyészet kora	Exponenciális növekedési		
	fázis		
	Átmeneti	Késői	Stacionárius
<u>óra</u>	<u>stádium</u>	<u>stádium</u>	<u>stádium</u>
0,5	<0,08	<0,08	<0,08
1,5	<0,08	<0,08	<0,05
2,5	<0,08	<0,08	<0,08
(az IAA adásakor)			
3,5	0,18	0,16	0,14
4,5	0,65	0,43	0,33
(az IAA adásakor)			
5,5	1,69	0,83	0,63
6,5	2,28	0,98	0,90

A tenyészet kora	A hEGF mennyisége (mg/l) Exponenciális növekedési fázis		
	Átmeneti	Késői	Stacionárius
	<u>stádium</u>	<u>stádium</u>	<u>stádium</u>
óra			
7,5	2,63	1,10	1,10
9,5	2,41	1,63	1,66
24,0	5,75	8,95	8,95

Megfigyelhető, hogy az IAA hozzáadása az exponenciális fázis késői stádiumában vagy a stacionárius fázisban nagyobb mennyiségű hEGF termelést segít elő.

5. referencia példa.

pBT23-at tartalmazó HB101 transzformánsokat alkalmazva tenyésztést végzünk ugyanolyan körülmények között, mint a 2. referencia példában (azzal a kivétellel, hogy a 4. táblázatban bemutatott tápközegeket alkalmazzuk). Amikor 4YTM9-et, M9-1-et és M9-2-t alkalmazunk tápközegként, az IAA-t 5,5' óra után adjuk be, és amikor M9-3-at és M9-4-et alkalmazunk, 9 óra után adjuk be, minden esetben 20 mg/l koncentrációban. A hEGF mennyiséget az egyes tápközegekben 9 és 24 óra után mérjük a tenyésztés beindításától számítva.

4. TÁBLÁZAT. A tápközegek összetétele

<u>4YM9</u>	<u>M9-1</u>	<u>M9-2</u>	<u>M9-3</u>	<u>M9-4</u>
M9 tápközeg	←	←	←	←
Bacto-tripton 32 g/l	Kazamínosav 10 g/l	5 g/l	←	2 g/l
Élesztőkivonat 20 g/l	Glükóz 5 g/l	←	2 g/l	←
	B ₁ vitamin 10 mg/l			
Ampicillin 100 mg/l	←	←	←	←

5. TÁBLÁZAT. A tápközeg összetétele és a hEGF termelés mennyisége

<u>Tápközeg</u>	A hEGF mennyisége (mg/l)	
	<u>9 óra után</u>	<u>24 óra után</u>
4YTM9	0,04	0,09
M9-1	0,68	0,70
M9-2	1,98	1,69
M9-3	3,03	7,25
M9-4	0,91	2,38

Amikor M9-3 tápközeget alkalmazunk (amely 5 g/l kazamínosavat és 2 g/l glükózt tartalmaz), a hEGF mennyiség maximumot ér el (7,25 mg/l). Meg kell említenünk, hogy a főleg természetes komponensekből (pl. élesztőkivonatból, Bacto-triptonból) álló tápközegekben, amelyekben nagy mennyiségű triptofán található, a hEGF termelés alacsony.

6. referencia példa

A trp promotor szabályozása a tápközegben triptofánnal.

A fentiekben ismertetett referencia példákban szereplő tenyészetek nem tartalmazzak triptofánt a tápközegben, és a természetes indukciós rendszerben a trp promotor indukciója akkor történik, amikor az előtenyészetből származó triptofán kisebb értékre csökken, mint egy adott koncentráció, amelynél az E.coli szaporodik. Ebben a rendszerben az IAA induktor megnövelheti a hEGF értékét, de közvetlenül nem kapcsolhatja ki a trp promotor indukcióját.

Így a triptofánt korábban adjuk a tápközeghez, hogy meglássuk, vajon a trp promotorból eredő indukció gátlható-e, és ha erre a következtetésre jutunk, meglássuk, lehetséges-e ezt a gátlást felfüggeszteni IAA hozzáadásával.

A hozzáadott triptofán mennyisége 1; 3; 10; 20; 30; és 40 mg/l, és IAA-t is adagolunk a 6. táblázatban bemutatott koncentrációkban.

pBT-23-at tartalmazó HB101 transzformánsokat alkalmazva tenyésztést végzünk ugyanolyan körülmények között, mint a 2. referencia példában. Az IAA-t öt órával a tenyészet beindítása után adjuk be. A tápközegben meghatározzuk a hEGF mennyiségét. Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be:

6. TÁBLÁZAT. A triptofán koncentrációja a tápközegben és a termelt hEGF mennyisége

Sor szám	Trip- tofán	IAA	hEGF mennyisége (mg/l)						
	kon- cent- ráció	kon- cent- ráció	1	3	5	7	9	11	24
	(mg/l)	(mg/l)	óra múlva	óra múlva	óra múlva	óra múlva	óra múlva	óra múlva	óra múlva
(1)	0	0	<0,08	0,22	1,44	2,15	2,68	3,75	6,35
(2)	0	20	<0,08	0,27	0,97	1,46	1,75	2,40	9,75
(3)	1	0	<0,08	0,27	1,18	1,84	2,45	4,33	7,75
(4)	1	20	<0,08	0,26	1,16	2,04	2,31	3,80	12,50
(5)	3	0	<0,08	0,29	1,09	1,74	3,45	4,58	9,50
(6)	3	20	<0,08	0,27	1,09	1,94	2,25	3,25	10,50
(7)	10	0	<0,08	<0,08	0,66	0,96	1,71	2,68	8,75
(8)	10	20	<0,08	<0,08	0,69	1,13	1,65	2,55	8,00
(9)	20	0	<0,08	<0,08	0,35	0,46	0,53	0,67	1,03
(10)	20	20	<0,08	<0,08	0,35	0,71	1,31	2,00	7,90
(11)	20	40	<0,08	<0,08	0,45	0,82	1,38	2,01	7,30
(12)	20	80	<0,08	<0,08	0,45	0,57	1,04	1,34	3,60
(13)	30	0	<0,08	<0,08	0,42	0,47	0,60	0,86	1,33
(14)	30	80	<0,08	<0,08	0,42	0,79	1,13	1,30	2,09
(15)	40	0	<0,08	<0,08	0,43	0,51	0,60	0,81	1,41
(16)	40	80	<0,08	<0,08	0,37	0,60	1,07	1,38	2,15

Amikor a tápközegbe adott triptofán mennyisége kevesebb,

mint 10 mg/l, a hEGF termelés mennyisége 6 és 10 mg/l között van, míg amikor a triptofán koncentrációja 20 és 40 mg/liter között van, a hEGF termelés mennyisége erősen lecsökken 1 és 1,5 mg/l közé. Így megállapíthatjuk, hogy egy meghatározott koncentrációnál több triptofán gátolja a hEGF termelését.

Abban az esetben, amikor a triptofán koncentrációja 20 mg/l, a hEGF termelése mintegy nyolcszorosára nő, amikor 20 vagy 40 mg/l IAA-t is adunk. Amikor azonban 80 mg/l IAA-t adunk, a hEGF termelés mennyisége csak négyszeresre emelkedik. Amikor a triptofán koncentrációja 30-40 mg/l, a hEGF termelés mennyiségében a növekedés 80 mg/l IAA hozzáadásával csekély, mintegy másfélszeres lesz.

Az előző eredményekből igazolódik, hogy triptofán hozzáadása megfelelő mennyiségben (20 mg/l ebben a példában) gátolja a trp promotorból eredő indukciót, és IAA hozzáadása (20-40 mg/l) felfüggeszti a triptofánnak ezt a gátlását a trp promotor kikapcsolásával. Az is megfigyelhető, hogy triptofán hozzáadása nyomnyi mennyiségben elősegíti az E.coli transzformánsok szaporodását (10-40 mg/l triptofán hozzáadásával a sejt mennyisége 1,5-2-szeres lesz). Az is megfigyelhető, hogy az IAA hozzáadása fölös mennyiségben, vagyis több, mint 40 mg/l koncentrációban gátolja az E.coli szaporodását, amely a termelt hEGF mennyiségében is csökkenést idéz elő.

Az eddig leírtakat az alábbiakban foglalhatjuk össze.

- (1) A szóban forgó hEGF csaknem teljes egészében kiválasztódik a tenyészlébe megfelelő inkubálást alkalmazva.
- (2) A HB101, TB1 vagy C600galK⁻ alkalmas E.coli gazdatörzsek.
- (3) A trp promotor indukálása IAA-val akkor optimális, amikor ez a késői növekedési fázisban adjuk.
- (4) 5 g/l kazaminosavval, 2 g glükózzal és 10 mg/l B₁ vitaminnal kiegészített tápközegek alkalmasak tápközegként.
- (5) IAA hozzáadásával lehetséges a trp promotor indukálása még akkor is, ha triptofán van jelen a tápközegben.

Annak felbecsülésére, hogy a nagy sűrűségű tenyészet fermentorban képes-e ezeket a tényeket figyelembe véve nagy léptékben létrejönni, kísérleteket hajtunk végre. Ezen kívül abból a célból, hogy ellenőrizhessük a nagy léptékű kísérleteket, az E.coli tenyészet felülúszójában levő hEGF tisztítását is vizsgáljuk, amelyhez új eljárás alakítunk ki.

1. kísérlet.

hEGF tisztítása

(1) Kationcserélő gyanta (BIO-REX70; a Biorad Inc. gyártmánya) (pH 3,0) adszorpciója → elúció (ammónium-acetát, pH 8,0) → dialízis (ammónium-acetát, pH 5,5).

(2) Anioncserélő oszlopkromatográfia (Q-Sepharose Fast Flow; gyártja a Pharmacia Fine Chemicals Inc.) (ammónium-acetát, pH 5,5).

(3) Fordított fázisú (C₁₈) oszlopkromatográfia (PepRPC; gyártja a Pharmacia Fine Chemicals Inc.; 0,1% trifluor-ecetsav/acetonitril → fagyasztva szárítás.

A jelen eljárás szerint az összes lépést 2-4 napon belül hajthatjuk végre. Ezen kívül az eljárás nem foglal magában gélszűrési kromatográfiát, amelyet hagyományosan alkalmaznak, hogy a léptéknövelés könnyű legyen.

Így pl. 10 mg tisztított hEGF-et kaphatunk 10 liter tenyészet~~felül~~felülúszóból ezzel az eljárással.

A tisztított hEGF-nek azonos aminosav-szekvenciája van, mint a természetes hEGF-nek, és N-terminális aminosavszekvenciája is azonos, mint a természetes hEGF-é. Ezután a következő kísérletekben megvizsgáljuk a tisztított hEGF biológiai

aktivitását.

2. kísérlet.

Az EGF receptor kötőképessége.

Az alább leírt eljárást követve igazoljuk a tisztított hEGF kötőképességét a humán sejtfelületi EGF receptorhoz.

Humán A431 sejteket szuszpendálunk 10^4 sejt/ml koncentrációban Dulbecco által módosított Eagle tápközegben (DMEM tápközeg; gyártja a Nissui Co., Ltd.), amely 10% borjúembrió szérumot (gyártja a Gibco Co., Ltd.) is tartalmaz. A sejtszuspenziót egy 24 üreges tenyésztő lemezre visszük fel, üregenként 1 ml-t, majd 37°C hőmérsékleten tenyésztünk 24 órán át 5% CO_2 -ben. Miután a sejteket kétszer mostuk olyan DMEM tápközeggel, amely 50 mmól/l N,N-bisz (2-hidroxi-etil)-2-amino-etánszulfonsavat (BES, pH 6,5) és 0,1% szarvasmarha szérum albumint (BSA; a Sigma Inc. gyártmánya) tartalmaz (kötő puffer), a sejtekhez 0,3 ml olyan kötő puffert adunk, amely 0,2 ng/ml ^{125}I -jelzett hEGF-et (gyártja az Amersham Inc.) és 0,1-10000 ng/ml hEGF-et is tartalmaz.

Miután szobahőmérsékleten állni hagytuk 1 órán át, a sejteket kétszer mossuk a kötő pufferral, és 0,2 mól/l nátriumhidroxid oldatot adunk hozzá üregenként 0,3 ml

mennyiségben, hogy a sejteket lizáljuk. Ezután mérjük az EGF receptorhoz kötött, ^{125}I -vel jelzett hEGF radioaktivitását. Az eredményeket a 7. táblázatban mutatjuk be.

7. TÁBLÁZAT. A tisztított hEGF kötőképessége humán EGF receptorhoz

hEGF ng/üreg/ 10^4 sejt	A kötés-gátlás aránya (%) [<u>tisztított hEGF</u>]
0,1	0
1	8
10	38
100	82
1000	95
10000	98

A fenti eredményekből beigazolódik, hogy a tisztított hEGF-nek kötő kapacitása van a tenyésztett humán sejtek EGF receptorához.

3. kísérlet.

Sejtnövekedés-gyorsító aktivitás.

Az alábbiakban leírt eljárást követve igazoljuk a tisztított hEGF sejtnövekedés-gyorsító aktivitását.

Swiss 3T3 egérsejteket szuszpendálunk 10^5 sejt/ml

koncentrációban olyan DMEM tápközegben, amely 10% borjúembrió-szérumot is tartalmaz. A sejtszuspenziót 24 üreges tenyésztő lemezre visszük fel, üregenként 1 ml mennyiségben, és 37 °C hőmérsékleten tenyésztjük 5% CO₂ atmoszférában, amíg a sejtek elérik az exponenciális növekedési fázis köztes stádiumát. A tápközeget 0,2% borjúembrió-szérumot is tartalmazó DMEM-re cseréljük ki, majd a tenyésztést tovább folytatjuk 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ atmoszférában. Amikor csaknem minden sejt eléri a stationárius fázist, hEGF-et adunk a tenyészethez és a tenyésztést tovább folytatjuk 8 órán át. [Metil-³H] timidint (247,9 GBq/mmól; gyártja az Amersham Inc.) adunk hozzá üregenként 0,5 µCi mennyiségben, 24 órás tenyésztés után meghatározzuk a sejtekbe beépült [³H] timidin radioaktivitását. Az eredményeket a 8. táblázatban mutatjuk be.

8. TÁBLÁZAT. A tisztított hEGF sejtnövekedés-gyorsító aktivitása.

Koncentráció (ng/ml)	<u>[³H] timidin bevitele</u>	
	<u>(cpm)</u>	<u>Hányad</u>
0,0	2864	1,00
0,3	3671	1,28
1,0	3753	1,31
3,0	4762	1,66

Az előbbieken leírt eredmények igazolják a tisztított hEGF

sejtnövekedés-gyorsító aktivitását.

4. kísérlet.

A savképzés gátlása a tengeri malac gyomorfal-sejtjeiben.

Az alább leírt eljárást követve a tisztított hEGF gátló hatását igazoljuk a gyomorsav képződésére izolált gyomorfal-sejtekben, indexként ^{14}C -aminopirin (AP) felgyülemlelést alkalmazva.

Miután az izolált fal-sejt szuszpenziót [$1,80 \times 10^5$ sejt/ml, Hank-féle oldat, amely 0,2% BSA-t tartalmaz (gyártja a Nissui Co., Ltd.)] 37°C hőmérsékleten 20 percen át 100% oxigénáramban tartottuk, $0,1 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -AP-t ($4,37 \text{ GBq/mmól}$; gyártja az Amersham Inc.), tisztított hEGF-et és stimulánsként 3 mól/l hisztamint (gyártja a Nakarai Chemical Co., Ltd.) vagy 1 mmól/l dibutilil-ciklikus AMP-t (dbc-AMP, gyártja a Sigma Inc.) adunk hozzá, és a keveréket tovább tartjuk ugyanezen a hőmérsékleten, 60 perc múlva 4 ml jéghideg Hank-féle oldatot adunk a keverékhez. Ezután kis sebességű centrifugálást végzünk 4°C hőmérsékleten, hogy a reakciót leállítsuk. A sejteket lizáljuk 0,3 ml 2 mól/literes nátrium-hidroxid oldat hozzáadásával. Miután semlegesítettünk 2 n sósavoldattal, mérjük a radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval.

A ^{14}C -AP felgyülemlelést úgy határozzuk meg, hogy a kontroll értéket kivonjuk a stimulálás hatására kialakult

felvételéből, ezt tekintjük 100%-nak, és a tisztított hEGF aktivitását a stimulálás százalékában fejezzük ki. Az eredményeket a 9. táblázatban mutatjuk be.

9. TÁBLÁZAT. A tisztított hEGF gátló aktivitása a savképződés ellen

			<u>% stimulálás</u>
Hisztamin, 3	mól/l		100
"	"	+ EGF 1 nmól/l	105
"	"	+ EGF 10 nmól/l	38,1
"	"	+ EGF 100 nmól/l	23,1
dbc-AMP, 1	mmól/l		100
"	"	+ EGF 1 nmól/l	106
"		+ EGF 10 nmól/l	82,1
"		+ EGF 100 nmól/l	50,8

A fenti eredményekből bebizonyosodott, hogy a tisztított hEGF-nek szintén van gyomorsavképződés-gátló aktivitása tengeri malac gyomorfal-sejtekben, amelyek akár hisztaminnal, akár dbc-AMP-vel vannak stimulálva.

1. példa

Fermentoros tenyésztési rendszer.

A fentebb leírt rázott lombikos tenyésztéssel kapott különböző eredményekre támaszkodva nagy léptékű tenyésztést hajtunk végre, 10 literes fermentort alkalmazva. Fermentorként 10 literes asztali fermentort alkalmazunk,

amely az Oriental Yeast Co, Ltd. gyártmánya. A fermentor szabályozó berendezéssel van ellátva a pH és az oldott oxigén koncentráció szabályozására a tápközegben. Gazdaszervezetként HB101-et alkalmazunk.

Előtenyésztést végzünk LB tápközegben és az előtenyészetből 2%-ot használunk inokulumként. Tápközegként 6 liter M9 tápközeget alkalmazunk (amely 5 g/l kazamino-savat, 2 g/l glükózt, 10 mg/l B₁ vitamint és 100 mg/l ampicillint tartalmaz). Az inkubálást 1 térfogat/térfogat/perc levegőmennyiséget alkalmazva (vagyis azonos mennyiségű levegőt táplálunk be percenként levegő-kompresszor segítségével, mint a tenyészet térfogata, azaz ez esetben 6 liter/percet) végezzük 37 °C hőmérsékleten, az oldott oxigén koncentrációt 4 ppm-re (amelyet a keverőlapát-szárnyak forgási sebességének 100 és 1000 fordulat/perc közti változtatásával szabályozunk), a pH-t 7,0-ra (amelyet 4 mól/l nátrium-hidroxid oldat cseppenkénti hozzáadásával szabályozunk) állítva be, és automatikus habgátlást alkalmazva (ahol a habgátlást úgy hajtjuk végre, hogy a hab-állapotot a fermentor felső részén található érzékelő mutatja ki, és ez avatkozik be úgy, hogy automatikusan szilikon-típusú habgátló szert adagol be cseppenként). 4,5 óra múlva IAA-t adunk be, ennek adagolási koncentrációja 20 mg/l.

Kontrollként rázott lombikos tenyésztést is végzünk azonos összetételű tápközegben, azonos előtenyészetet alkalmazva, és ugyanolyan körülmények között, mint ahogyan ezt a 2. referencia példában leírtuk. Az eredményeket az 5. ábrában

mutatjuk be.

Mind a fermentoros tenyészetben, mind a lombikos tenyészetben a hEGF termelés 4 óra múlva kezdődik el és csaknem azonos mennyiségben folytatódik ezután 9 órán át. 24 óra múlva azonban 9 mg/l termelés figyelhető meg a rázott lombikos tenyészetben, míg a fermentoros tenyészetben csak 2 mg/l termelés jegyezhető fel, amely csaknem azonos azzal a mennyiséggel, amely 9 óra után figyelhető meg.

Ennél fogva világosan megérthető, hogy a hagyományos egy tételes fermentoros rendszerben nem lehetséges javítani a hEGF termelés mennyiségét. Ennek oka véleményünk szerint az, hogy a fermentoros tenyészetben az oldott oxigén mennyisége és a pH állandó szinten van tartva és az optimális körülmények az E.coli szaporodásához úgy vannak beállítva, hogy a tápközegben a triptofán fogyjon és egy meghatározott koncentráció alá csökkenjék; amikor a trp promotor működni kezd, a tápanyag-források (szénforrások, nitrogén-források, stb. a tápközegben kimerültek.

Ezért kísérletezünk a rátáplálásos rendszerrel, amint az alábbiakban leírjuk; ebben a tenyésztés során a friss tápközeget folyamatosan kiegészítjük.

2. példa

Rátáplálásos rendszer - 1. rész

Az 1. példánál leírt körülmények között egy kiegészítő tápközeget (M9 tápközeg, amely 20 g/l kazamino-savat, 200

g/l glükózt, 10 mg/l B, vitamint, 100 mg/l ampicillint és 20 mg/l IAA-t is tartalmaz) adagolunk 30 ml/óra sebességgel 24 órán át csőszivattyúval, attól az időponttól számítva, amikor az IAA-t adagoljuk. Kontrollként rázólabdikos tenyésztést is végzünk. Az eredményeket a 6. ábrában mutatjuk be.

A fermentoros tenyészetben a hEGF termelés 6 óra múlva növekedni kezd, 9 óra után 25 mg/l értéket mutat, 24 óra után 55 mg/l értéket mutat; ez mintegy 25-szöröse annak az értéknek, amelyet az 1. példa fermentor-rendszerében kaptunk.

A maximum azonban még mindig csak mintegy 55 mg/l és a sejtszaporodási érték mintegy 6 az OD₅₅₀-nél, amely eredmények még nem érik el a nagy sűrűségű tenyészetben várt eredményeket. Így további tanulmányokat végzünk.

Ismeretes, hogy a tápközeghez előzetesen triptofánt adva a sejtmennyiség növekszik. Ennél fogva triptofánt adunk az alap-tápközeghez, hogy úgy gátoljuk a trp promotor működését, hogy ugyanakkor megkíséreljük elérni a sejtmennyiség növekedését. Ebben az esetben felismerhető, hogy amikor a triptofán marad a tápközegben, ez gátolja a trp promotor működését, ha IAA-t adunk hozzá. Ezért kíváncsiak vagyunk, hogy a triptofán addigra elbomoljék, amikor az IAA-t adagoljuk.

Másrészt a glicerinnel nem okoz katabolit-repressziót, ellentétben a glükózzal. Azt is tudjuk, hogy amikor a

katabolit-represszió eltűnik, triptofanáz (triptofán-bontó enzim) termelődik, hogy elbontsa a triptofánt az E.coliban.

Az előzőekben leírtak alapján megkíséreljük a glicerinnel alkalmazását glükóz helyett a kiegészítő tápközegben. Amikor így teszünk, azt várjuk, hogy amikor a glükóz az alap-tápközegből kimerül, a katabolit-represszió elvész, triptofanáz termelődik, a triptofánt felhasználja és így a trp promotor működni kezd.

Ezen kívül a kiegészítő tápközeg adagolási sebességét is változtatjuk az E.coli szaporodásának függvényében, hogy megtaláljuk a legjobb találmányunk szerinti eljárást.

3. példa

Rátáplálós rendszer - 2. rész

A tápközeg-kompozíció és a tenyésztési körülmények azonosak azzal, mint amelyeket az 1. példában leírtunk, azzal a különbséggel, hogy az alap-tápközeghez triptofánt adunk 30 mg/l mennyiségig. A kiegészítő tápközeget (M9 tápközeg, amely 5 g/l kazamino-savat, 200 g/l glükózt, 10 mg/l B, vitamint, 100 mg/l ampicillint és 5 mg/l IAA-t is tartalmaz) a tápközeghez 3 órával később kezdjük el hozzáadni, míg az IAA-t négy órával később adjuk be. Az IAA-t 5 mg/l koncentrációban adjuk be, mivel a fölösleges mennyiségű IAA gátolhatja az E.coli szaporodását és a hEGF termelést.

A tápközeg adagolásához PI csőszivattyút (gyártja a Pharmacia Fine Chemicals Inc.) és személyi számítógépet (PC

9801 VX41; a Nippon electric Co., Ltd. gyártmánya) alkalmazunk. Az adagolás sebességét úgy programozzuk, hogy az adagolás teljes időtartama alatt 49 változás történjék. Az E.coli szaporodását és a hEGF termelés mennyiségét a 7. ábrában mutatjuk be.

Mintegy 5 órával azután, hogy az E.coli szaporodási sebessége csökken, megindul a hEGF termelés, és 24 óra múlva eléri a 70 mg/l-t. A sejtszaporodás szintén növekszik, 9-re OD₅₅₀ értékben.

Az előző eredményekből megállapítható, hogy a hEGF termelés úgy növekszik, ahogyan a sejtmennyiség növekszik.

Így abból a célból, hogy nagyobb sűrűségű tenyészetet érjünk el, a tápközeg összetételét és az adagolás időzítését részletesen tanulmányozzuk. Pontosabban az E.coli gazdaszervezet szaporodásához szükséges aminosavakat adunk a tápközeghez, és a kiegészítő tápközegben a szénforrást glükózzal glicerinnel cseréljük.

Amint fentebb leírtuk, glükóz jelenlétében a triptofán fogy, ahogyan az E.coli szaporodik, de nem triptofánáz révén bomlik el. Ezért megkíséreljük, hogy glükózt és triptofánt adunk a kezdeti kiegészítő tápközeghez, hogy megfelelően szaporítsuk az E.colit, ugyanakkor megakadályozzuk, hogy a trp promotor működjék. Ezután IAA-t adunk hozzá és ugyanekkor a kiegészítő tápközeget olyanra cseréljük ki, amely glicerint tartalmaz; ilyen módon a triptofán elbomlik, hogy megerősítse az IAA működését és így a hEGF termelésének

mennyisége növekedjék.

4. példa

Rátáplásos rendszer - 3. rész.

Tenyésztést végzünk az alábbiak szerint, a fentebbiekhez hasonló rátáplásos rendszerben.

(1) Tápközeg összetétel.

1. Alap-tápközeg

M9 tápközeget az alábbiakkal egészítünk ki:

2,5 g/l kazamino-sav, 10 g/l glükóz, 50 mg/l triptofán, 0,5 g/l prolin, 1,0 g/l leucin, 10 mg/l B₁ vitamin, 100 mg/l ampicillin és nyom-fémsók.

2. 1. kiegészítő tápközeg.

M9 tápközeget az alábbiakkal egészítünk ki:

40 g/l kazamino-sav, 300 g/l glükóz, 50 mg/l triptofán, 5 g/l prolin, 5 g/l leucin, 10 mg/l B₁ vitamin, 100 mg/l ampicillin és nyom-fémsók

3. 2. kiegészítő tápközeg.

4,0 g/l kazamino-sav, 300 g/l glicerín, 5 g/l prolin, 5 g/l leucin, 10 mg/l B₁ vitamin, 100 mg/l ampicillin és nyom-fémsók.

(2) Tenyésztési körülmények.

A plazmid, illetve gazdaszervezet a pBT23, illetve HB101.

A tenyésztési térfogat (alaptápközeg + 1. kiegészítő

tápközeg + 2. kiegészítő tápközeg) 5 liter + 0,5 liter + 1,0 liter.

A tenyésztési hőmérséklet 37°C , és a pH érték 7,0.

A levegőztetés mennyisége 1,5 térfogat/térfogat tápközeg (vagyis 7,5 liter/perc).

A kevertetés fordulatszáma 900 fordulat/perc.

Automatizált habgátlás (szilikon-típusú habgátlószer cseppenkénti adagolásával).

A tápközeg adagolásának időzítése: 1. kiegészítő tápközeget adunk 0,5 és 6 óra között (ahol az adagolás sebessége változó) a tenyészet beindulásától számítva, és 2. kiegészítő tápközeget adunk 6 és 24 óra között (ahol az adagolás sebessége állandó, 50 ml/óra) a tenyészet beindulásától számítva.

Az IAA-t a beindulástól számított 6. órában adjuk be, ennek koncentrációja 5 mg/l.

Az előtenyésztő tápközeg azonos az alaptápközeggel.

Az inokulum mennyisége 10%.

Az 1. kiegészítő tápközeg betáplálásának sebességét úgy programozzuk, hogy 20 változás történjék az adagolás teljes menete során. Az E.coli szaporodását és a hEGF termelés mennyiségét a 8. ábrában mutatjuk be.

Az OD_{550} érték 24 óra után 42 értéket mutat, jelezve, hogy

nagyobb tenyésztési sűrűséget érünk el. A hEGF 160 mg/l mennyiségben termelődik.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Genetikai manipulációs technikai eljárás hEGF előállítására egy hEGF-et kódoló génnek valamely vektorba iktatásával, E.coli gazdaszervezetnek transzformálásával ezen vektorral, az így kapott transzformáns tenyésztésével és a kapott hEGF-nek a tenyészközegből való kinyerésével és összegyűjtésével azzal jellemezve, hogy egy triptofán (trp) operonhoz szolgáló promotort kódoló gént és E.coli alkálikus foszfatáz génhez szolgáló szignál peptidet kódoló gént integrálunk egy hEGF génbe a "fölfelé" levő területben, és folyamatosan két terminációs kodont és egy transzkripció terminátort integrálunk a "lefelé" lévő területben.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás hEGF előállítására azzal jellemezve, hogy a tenyésztés során 3-indol-akrilsavat (IAA) adunk a tenyészethez, ilyen módon szabályozva az időtartamot és az E.coli gazdaszervezet által termelt hEGF mennyiségét.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás hEGF előállítására azzal jellemezve, hogy tenyészetként nagy sűrűségű tenyészetet alkalmazunk, hatékonyan alkalmazva a rátáplálósos rendszert, amelyben az adagolás sebességét szabályozzuk.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás hEGF előállítására azzal jellemezve, hogy a rátáplálósos rendszerben olyan kiegészítő tápközeget adagolunk, amelyben szénforrásként

glükózt vagy glicerint, vagy glükóz és glicerin kombinációját alkalmazzuk.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás hEGF előállítására azzal jellemezve, hogy a rátáplálásos rendszerben olyan kiegészítő tápközeget adagolunk, amelyben szénforrásként előbb glükózt, majd glicerint alkalmazunk.

42 oldal + 9 társoldal
Rtkene!

A meghatalmazott:

Válos
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda, Kft.
8.

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

52552==

trp Promotor
 HindIII
 AGCTTTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAG
 AACC GTTTATAAGACTTTACTCGACAAC TGT TAATTAGTAGCTTGATCAATTGATC
 SD szekvencia E. coli alkálikus foszfatáz
 TACGCAAGTT CACGTAAAAAGGGTATCGACAATGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACT
 ATGCGTTCAAGTGCATTTTCCCATAGCTGTTACTTTGTTTCGTGATAACGTGACCGTGA
 szignál peptid gén
 EcoRI
 CTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCG
 GAATGGCAATGACAAATGGGGACACTGTTTTCGCTTAA

1. ÁBRA

A trp promotor, az DS szekvencia és az E. coli alkálikus foszfatáz szignál peptid gén szekvenciája

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

EcoRI
 AATTCCGACTCTGAATGTCCGCTGTCTCATGATGGTTACTGTCTGCACGATGGTGTGTTGT
GGCTGAGACTTACAGCGACAGAGTACTACCAATGACAGACGTGCTACCACAAACA

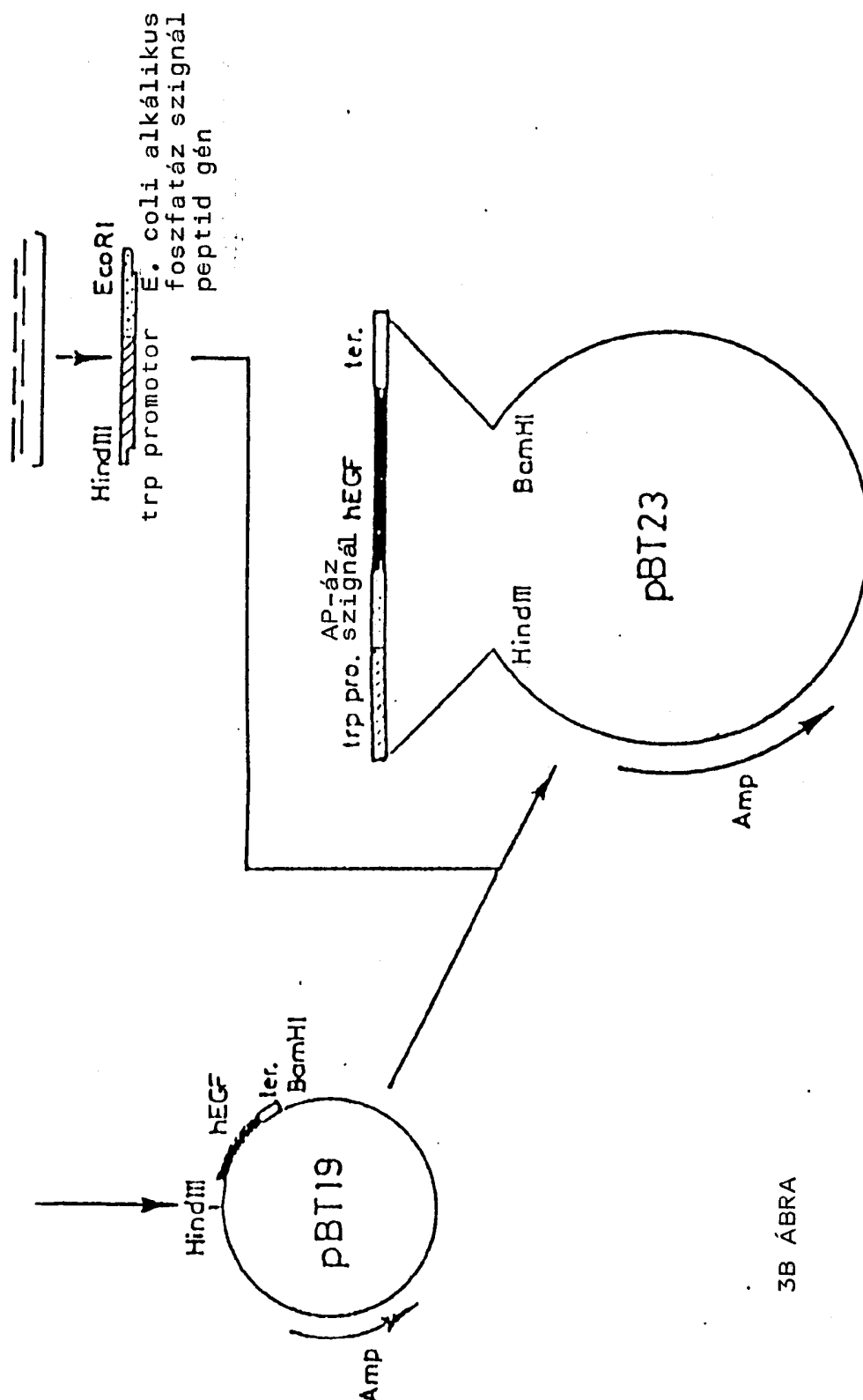
hEGF gén
 SphI
 ATGTACATCGAAGCACTGCATAAATACGCATGCAATTGTGTAGTTGGTTACATCGGTGAA
 TACATGTAGCTTCGTGACCTATTTATGCGTACCTTAACAATCAACCAATGTAGCCACTT

SacI
 CGTTGCCAATACCGTGATCTGAAATGGTGGGAAGTCCGCTGATAGAGCT
 GCAACGGTTATGGCACTAGACTTTACCAACCTTGACGCGACTATC.....

2. ÁBRA

A hEGF gén szekvenciája

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3B ÁBRA

3A és B ábra A kiválasztás kifejező plazmid előállítása

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNYKÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

HindIII | trp. Promotor |

AGCTTTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAG
AACCGTTTATAAGACTTTACTCGACAACCTGTTAATTAGTAGCTTGATCAATTGATC

| SD szekvencia | E. coli alkálikus foszfatáz

TACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCGACAATGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACT
ATGCGTTCAAGTGCAATTTTCCCATAGCTGTTACTTTGTTTCGTGATAACGTGACCGTGA

szignál peptid gén | EcoRI

CTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCGAATTCCGACTCTGAATGTCCGCTGTC
GAATGGCAATGACAAATGGGGACACTGTTTTTCGCTTAAGGCTGAGACTTACAGGCGACAG

| hEGF gén |

TCATGATGGTTACTGTCTGCACGATGGTGTTTGTATGTACATCGAAGCACTGGATAAATA
AGTACTACCAATGACAGACGTGCTACCACAAACATACATGTAGCTTCGTGACCTATTTAT

SphI

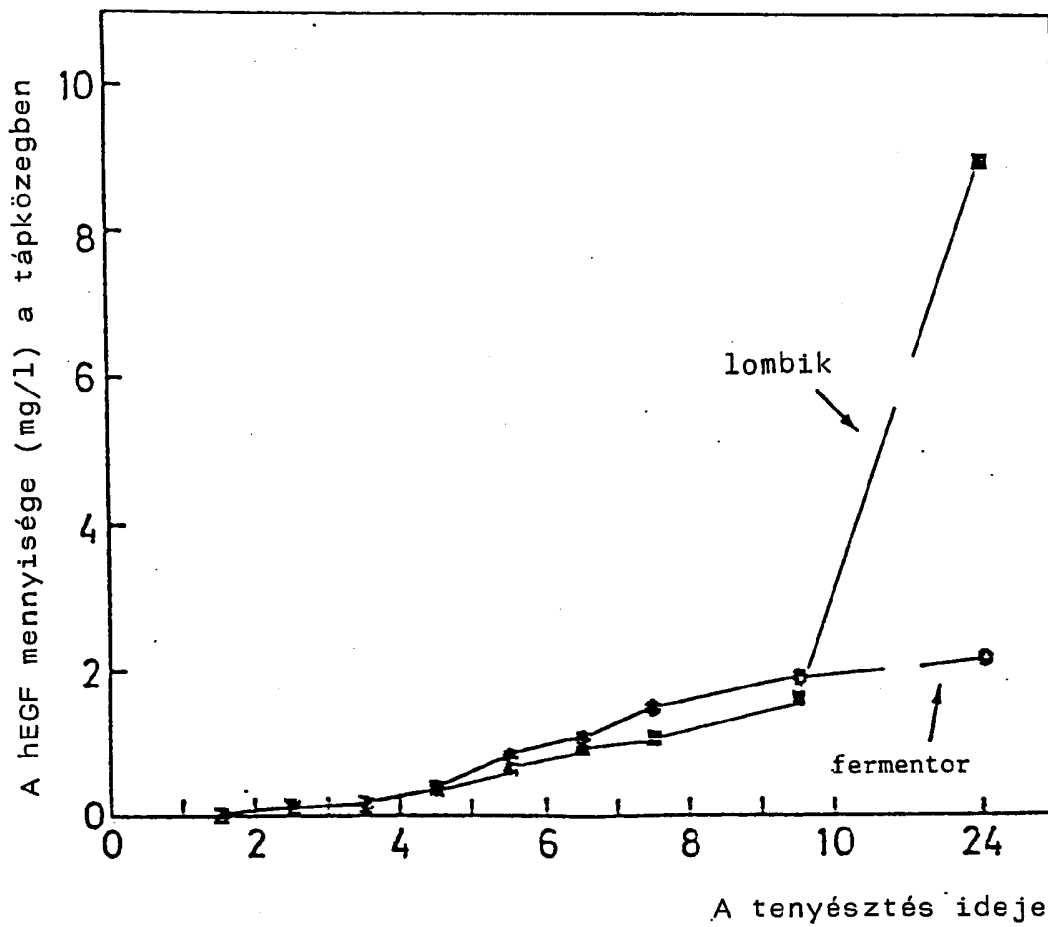
CGCATGCAATTGTGTAGTTGGTTACATCGGTGAACGTTGCCAATACCGTGATCTGAAATG
GCGTACGTTAACACATCAACCAATGTAGCCACTTGCAACGGTTATGGCACTAGACTTTAC

| SacI | trpA. terminátor | BamHI

GTGGGAACTGCGCTGATAGAGCTCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTCTG
CACCTTGACGCGACTATCTCGAGTCGGGCGGATTACTCGCCCGAAAAAAGACCTAG

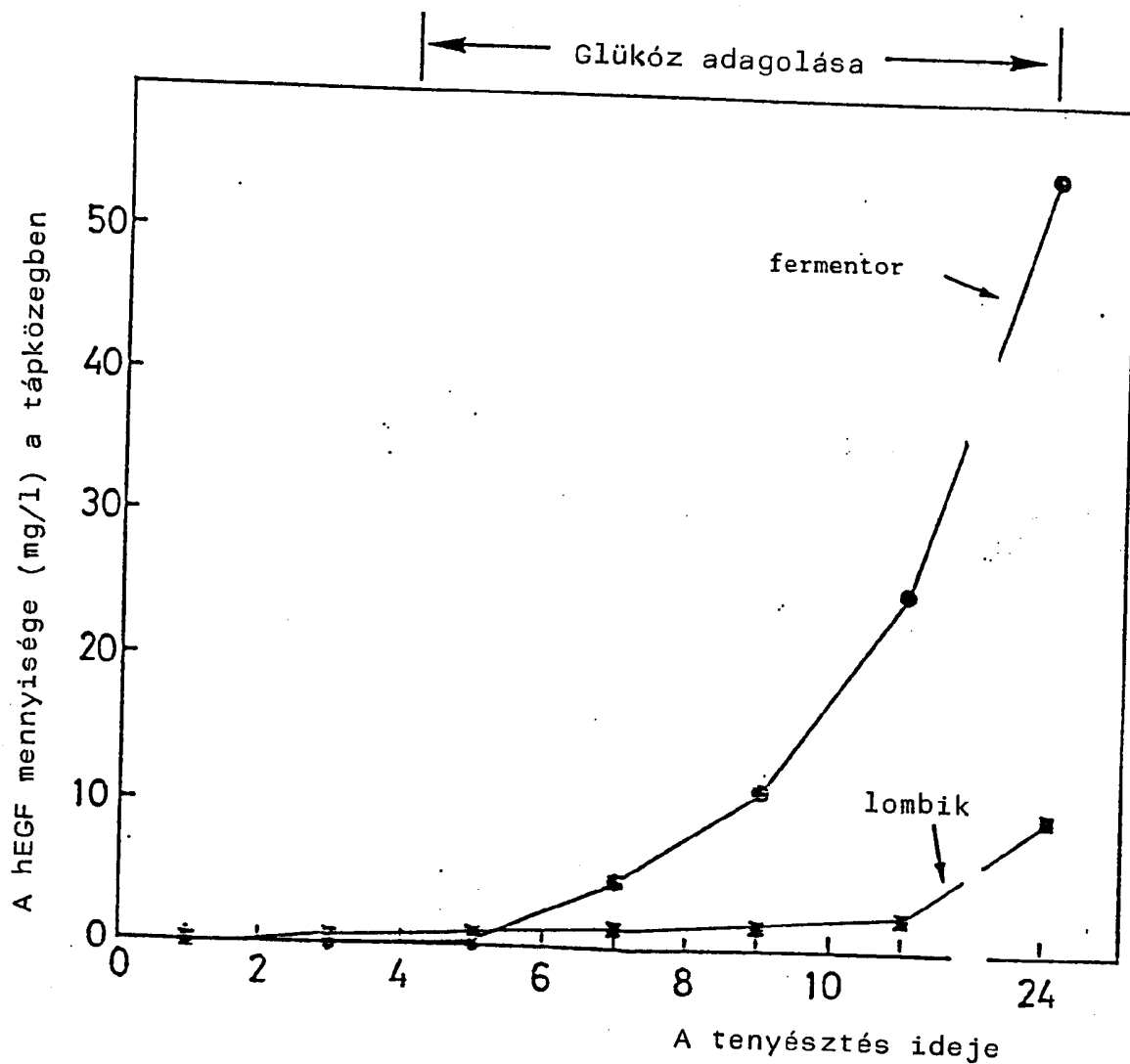
4. ÁBRA

A pBT23 kiválasztó kifejező plazmid HindIII-BamHI
fragmentumainak szekvenciája

**KÖZMŰTÉTELI
PÉLDANY**

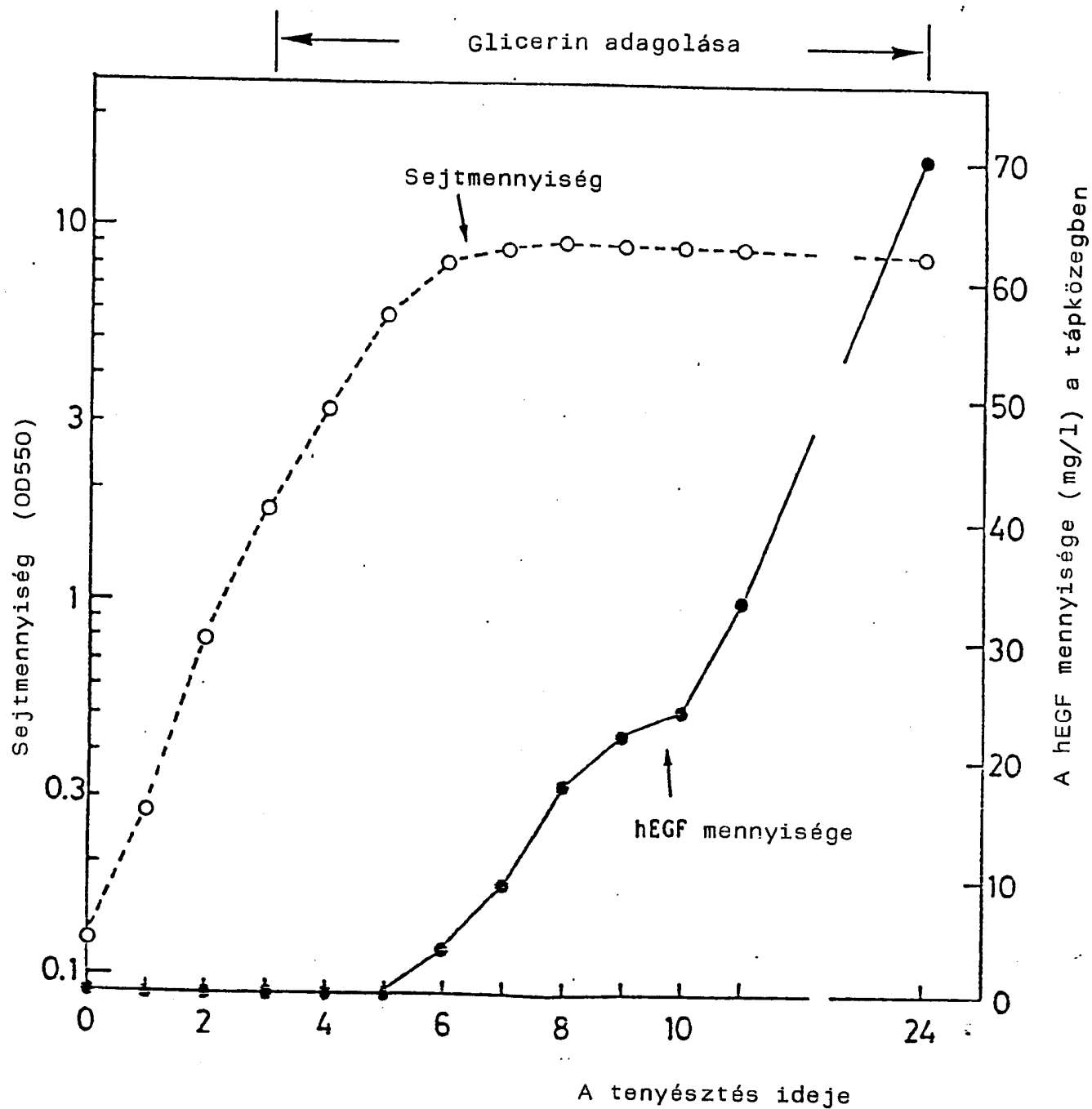
5. ÁBRA

Fermentoros tenyésztés (egylépéses eljárással)

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

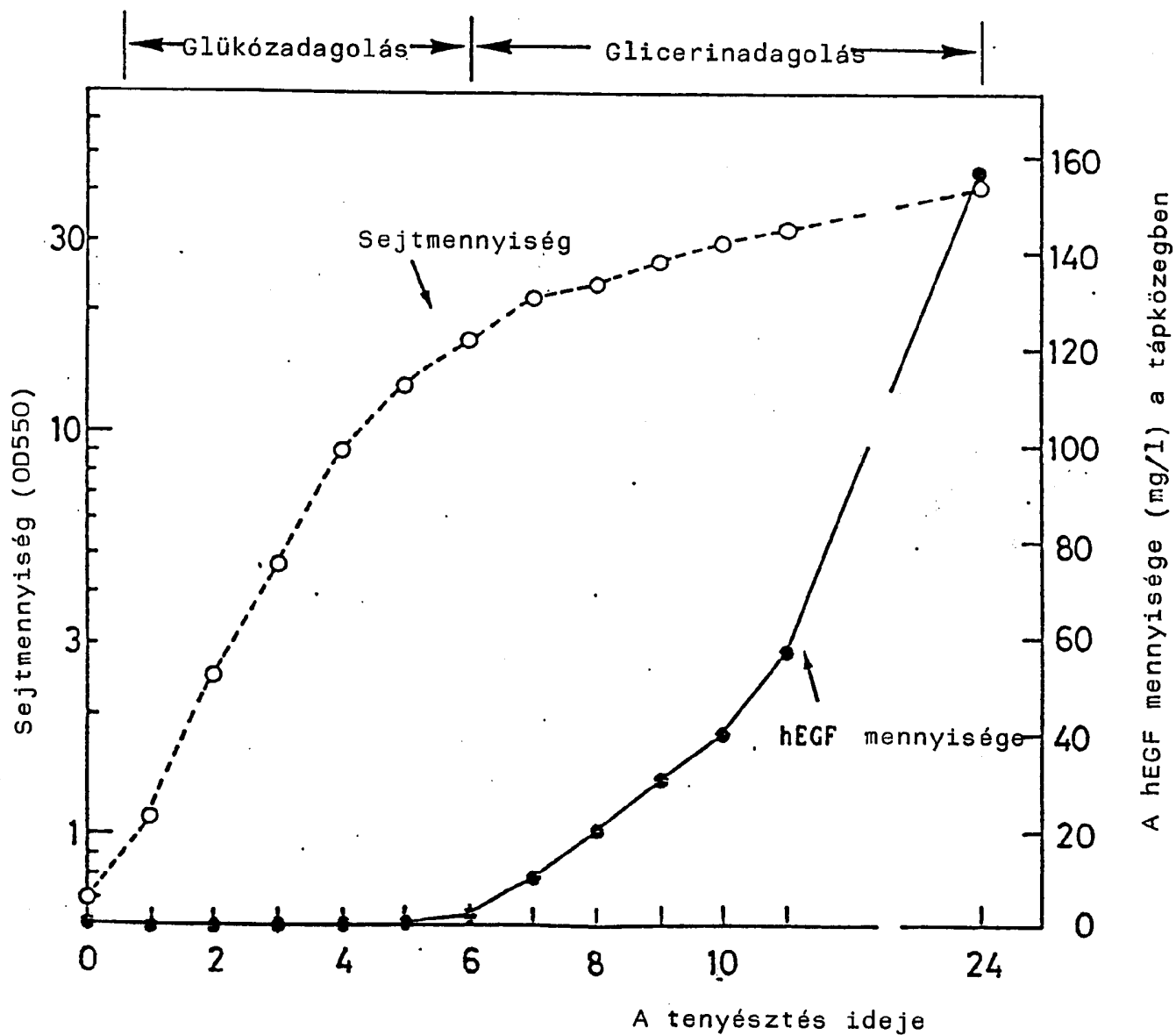
6. ÁBRA

Fermentoros tenyésztés (rátáplálós rendszer
- 1. rész)



7. ÁBRA

Fermentoros tenyésztés (rátáplálós rendszer
- 2. rész)

**KÖZLEKEDÉSI
PÉLDÁNY**

8. ábra

Fermentoros tenyésztés (rátáplálásos rendszer - 3. rész)