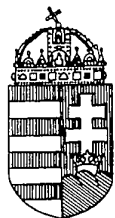


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

208 340 B

(21) A bejelentés száma: 4686/86
(22) A bejelentés napja: 1986. 11. 13.
(30) Elsőbbségi adatok:
255 607/851985. 11. 14. JP

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/86

C 12 N 15/62

C 12 P 21/02

(40) A közzététel napja: 1987. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 09. 28. SZKV 93/09

(72) Feltalálók:

Mitsuru, Furusawa, Tokio (JP)
Susumu, Maeda, Tottori (JP)
Tadashi, Horiuchi, Tokio (JP)
Yasumasa, Marumoto, Tokio (JP)
Yoshinari, Sato, Tokio (JP)
Yoshiyuki, Saeki, Tokio (JP)

(73) Szabadalmaz:

Daiichi Seiyaku Co. Ltd., Tokió (JP)

(74) Képviselő:

S.B.G. és K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda,
Budapest

**(54) Eljárás rekombináns Bombyx mori központi polihedrózis vírus és fúziós
proteinek előállítására**

(57) KIVONAT

Eljárás rekombináns Bombyx mori központi polihedrózis vírus előállítására, melynek során

Bombyx mori sejteket vagy rovar BmNPV DNS-sel és egy olyan plazmiddal fertőzünk, mely 5'→3' sorrendben a Bombyx mori központi polihedrózis vírus DNS (BmNPV DNS) polihedrális proteint kódoló struktúrgénjét megelőző promoter-szekvenciát, ugyanennek a struktúrgénnek részét vagy egészét, adott esetben egy

kapcsoló bázisszekvenciát, a kívánt, BmNPV-re exogén proteint kódoló struktúrgént, a kívánt peptid terminátor bázisszekvenciáját, és a polihedrális proteint kódoló struktúrgént követő 3'-bázisszekvenciát tartalmazó plazmiddal fertőzünk, a sejteket tenyésztjük, majd a rekombináns BmNPV-t kinyerjük.

A találmány továbbá a fenti BmNPV-vírusvektorral történő fúziós proteinek előállítására is vonatkozik.

A találmány tárgya selyemhernyó (*Bombyx mori*) rekombináns központi (nukleáris) polihedrózis vírusok előállítására, és ilyen rekombináns vírusokat alkalmazva peptidek előállítására.

Beszámoltak már peptid-előállítási módszerről *Bombyx mori* központi polihedrózis vírust (BmNPV) alkalmazva (lásd a leírás végén az 1. sz. irodalmi hivatkozást).

Ennek a módszernek a fő jellemzője abban áll, hogy rekombináns BmNPV-t alkotnak meg egy kívánt fehérje struktúrgénjével, a poliéderez fehérjét kódoló struktúrgén egy részletének helyettesítésével rekombináns DNS technikát alkalmazva, és a rekombináns BmNPV-t szaporítják tenyésztett selyemhernyó (*Bombyx mori*) sejteken vagy élő selyemhernyókban, ilyen módon a kívánt fehérje itt felgyülemlik. Ez a módszer azonban még nem kielégítő a kívánt fehérjék kitermelése szempontjából.

Ezen kívül a fúziós fehérjék előállítása már *Escherichia coli*-ban és megvalósult. A kitermelésekkel kapcsolatban azonban nem tudtak beszámolni jelentős javulásról (2–8. irodalmi hivatkozások).

Röviden összefoglalva a jelen találmány rekombináns *Bombyx mori* központi polihedrózis vírus DNS poliéderez fehérje-kódoló struktúrgénje mellett egy, a kívánt fehérjét kódoló struktúrgénnel rendelkezik a poliéderez fehérjét kódoló struktúrgén egészéhez vagy egy részéhez kapcsolva vagy kapcsoló (linker) bázisszekvencia közbeékelésével vagy anélkül.

A jelen találmány foglalkozik még egy fúziós fehérje előállítási módszerével is, a rekombináns vírust tenyésztett *Bombyx mori* sejtekben vagy élő *Bombyx mori*-ban szaporítva.

A találmány továbbá foglalkozik a kívánt fehérje előállításával a fúziós fehérje hasítása vagy elbontása révén a benne levő kapcsolási helynél.

A mellékelt ábrákban az 1–6. ábra vázlatosan bemutat bizonyos, a rekombináns vírus előállításához alkalmazott plazmidokat, amelyek egy-egy példában szerepelnek.

A 7. és a 8. ábra a kívánt fúziós fehérje elektroforetikus mintáját ábrázolja.

Az alábbiakban a találmányt részletesebben ismertetjük. A BmNPV széles körben ismert a selyemhernyó tenyésztők között. A T3 törzs olyan tipikus törzs, amelyet a jelen találmány feltalálói izoláltak. Ennek a törzsnek a vírus DNS-e (BmNPV DNS) letétbe van helyezve az ATCC-nél az Amerikai Egyesült Államokban, ahol az az ATCC 40 188 letéti számot kapta.

A polihidrális fehérjéhez tartozó struktúrgént tartalmazó rész izolálásához a vírus DNS-ből többek között az EcoRI-vel végzett kezelés alkalmas, amint ezt az 1. irodalmi hivatkozásban leírják. Egy *Escherichia coli* törzs (*E. coli* K12JM83 DGB-0036), amely a pBmE36 plazmidot hordozza a vírus DNS egy (mintegy 10,5 kb-s) EcoRI-EcoRI fragmensével az EcoRI hasítási helynél beiktatva a plazmidba, a Fermentation Research Institute-nél (Fermentációs Kutatóintézet) [Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry of Japan

(Japán Nemzetközi Kereskedelmi és Ipari Minisztériuma, Ipari Tudományok és Technológiák Képviselője)] van letétbe helyezve FERM BP-813 letéti számon.

Ezen kívül, amint ezt az 1. számú irodalmi hivatkozásban leírták, a pBmE36, amikor HindIII-mal kezelik, mintegy 3,6 kb hosszúságú fragmenst ad, amely tartalmazza a polihidrális fehérje struktúrgénjét. A fragmenst azután beiktatják a kereskedelmi forgalomban kapható puC9 plazmidba (a Pharmacia P-L Biochemicals cégnél rendelkezésre áll). Az ezt követő EcoRI hasítás, Ba131 kezelés (amelynek segítségével hosszúságban különböző fragmenseket lehet előállítani a kezelési idő beállításával), majd HindIII hasítás, vagy hasonló eljárások olyan fragmenst nyújtanak, amely tartalmazza a polihidrális fehérje gén egészét vagy egy részét.

A kívánt fehérje struktúrgénjét össze lehet kapcsolni a polihidrális fehérje gén egészével vagy egy részével megfelelő kapcsolódó DNS alkalmazásával (lásd a 19. irodalmi hivatkozást) és a termelt összekapcsolt fehérje, amikor megfelelő módon elhasítják a kapcsoló bázisszekvenciának megfelelően lefordított peptid vagy aminosav helynél (kötő rész), a kívánt fehérjét adja, amelyet azután hagyományos módszerekkel lehet izolálni. Amikor a fúziós (összekapcsolt) fehérje önmagában is használható, az elhasítási folyamat természetesen nem szükséges. Ilyen esetekben a kapcsoló lehet, hogy nincs is jelen.

Többek között ismertek mint megfelelő kapcsoló peptid vagy aminosav (kapcsoló rész) és az ugyanezt elhasító vagy elbontó eszköz: az Ile-Glu-Gly-Arg szekvencia és az Xa vér koagulációs faktor (amelyet ezután „F-Xa”-nak nevezünk), amely képes a szekvencia hasítására; a Pro-Ama-Gly-Pro (ahol Ama bármilyen fajta aminosav) és kollagenáz, amely képes a szekvencia hasítására; Arg és Phe és tripszin, amely képes a peptid-kötés hasítására ezek mögött; Tyr vagy Phe és kimotripszin, amely képes a peptidkötés hasítására ezek mögött; Pro-Arg és trombin, amely képes hasítani a peptid kötést ezek mögött; triptofán és N-brómszukcinimid, amely képes elbontani ezt; és metionin és cianogén-bromid, amely képes elbontani ezt (lásd 2–10. irodalmi hivatkozások). A kapcsoló rész és a hasítás vagy elbontás eszközei nem korlátozódnak a fentebb említettekre, és különböző peptidek vagy aminosavak valamint különböző kémiai vagy enzimes módszerek sok más megfelelő kombinációját lehet alkalmazni a kapcsoló részhez, vagy a hasítási, illetve elbontási eszközökhöz.

Kíváncos, hogy a kívánt fehérje ne tartalmazzon olyan peptidet vagy aminosavat, amely elbomolhat, ha kapcsoló-rész hasítási vagy elbontási folyamatnak vetjük alá, pl. a fentebb említetteknek. Lehetséges azonban elbontani a fúziós fehérjét korlátozott hatású módszerekkel is, megfelelően behatárolt, mérsékelt körülmények között, ilyen módon érve el célunkat.

Az ezeket a fehérjéket kódoló gének lehetnek természetben előforduló anyagokból izolált kromoszomális DNS-ek, a természetes eredetű mRNS-ek intermediereit át készített cDNS-ek, kémiaiilag szintetizált

DNS-ek, vagy az éppen említett példák szerinti technikák megfelelő kombinációjával termelt DNS-ek (lásd a 18. és 19. irodalmi helyeket).

Olyan termék esetében, amely valamelyest különbözik az aminosav szekvenciájában [helyettesítés, elhagyás (delécio), hozzáadás (addíció)] a szándékolt anyagtól, de még rendelkezik a kívánt funkciókkal, mint pl. fiziológiai aktivitással, szándékosan lehet módosítást végezni ilyen hatáshoz. Így pl. amikor a metionint el akarjuk bontani cianogén bromiddal a fentebb említett kapcsoló résszel összefüggésben, a kívánt fehérjében jelen levő metionin gyököt vagy gyököket lehet helyettesíteni más aminosavgyökkel vagy más aminosav-gyökkel, vagy törölni lehet. Ebben az esetben tanácsos, ha a fenti koncepcióval megegyezően tervezett bázisszekvencia alapján termelt peptidet megvizsgáljuk, vajon aktivitása megfelel-e a szándékozott célnak vagy sem.

Bizonyos példákban egy aminosavgyökrész megmaradhat a kívánt fehérje termékben, amint ez látható pl. a cisztein kémiai elbontása esetében 2-nitro-5-tiocianobenzoesavval. Ebben az esetben a terméket előnyösen szintén meg kell vizsgálni aktivitásra, amint fentebb említettük, ezáltal meghatározva, vajon a termék alkalmas-e a szándékolt célra vagy sem.

Plazmidokat (rekombinációhoz szükséges plazmidok) olyan bázisszekvenciával, amely a Bombyx mori központi polihedrális vírus DNS (BmNPV DNS) poliédres fehérje génjének egy részét vagy egészét, és a kívánt fehérjéhez tartozó egy struktúrgént egymással összekapcsolva (egy kapcsoló betoldásával vagy anélkül), vagyis a fúziós fehérjét kódoló gént tartalmazza magába beleiktatva, elő lehet állítani hagyományos rekombináns DNS technikákkal, olyan plazmidokat, restrukciós enzimeket és más anyagokat használva, amelyek kereskedelmi forgalomban kaphatók. Az ilyen plazmidok előállítását rutinszerűen lehet elvégezni az itt a későbbiekben leírandó példák alkalmazásával.

A fenti plazmidokat alkalmazva a rekombináns vírusok előállításához, egy ismert Bombyx mori sejtvonalon sejtjeit kevert fertőzésnek vetjük alá egy rekombinációhoz szükséges plazmiddal és BmNPV-vel, ha szükséges, ezt követi a rekombináns vírus izolálása pl. a tarfolt (plakk) módszerrel (11. irodalmi hivatkozás), vagy a hígítási módszerrel (12. irodalmi hivatkozás). A megfelelő, már létező Bombyx mori sejtvonalak, amelyeket alkalmazni lehet, többek között magukba foglalják az ismert Bm sejteket (BM-N sejtek, amelyek az 1., 11. és 13. irodalmi hivatkozásokban vannak leírva, és az ATCC-nél CRL-8910 számon vannak letétbe helyezve), és a BM-N5 sejteket, amelyek az ATCC-nél CRL-8851 számon vannak letétbe helyezve. Hogy egy kívánt anyagot selyemhernyóban állíthassunk elő, a selyemhernyókat vírusfertőzésnek vetjük alá olyan módon, hogy a tenyésztett sejtekben szaporított vírust (vagy a rekombináns és nem-rekombináns vírusok keverékét, vagy az ebből izolált rekombináns vírust) beinjektáljuk vagy perkután vagy a testüregbe, vagy a vírust a táplálékkal a szájon keresztül adjuk be. Ezután a selyemhernyókat mesterséges

takarmánnyal vagy eperfalevelekkel etetjük megfelelő számú napon át, ezáltal felgyülemlik a kívánt fúziós fehérje. Általában a fúziós fehérje nem oldható vízben és a selyemhernyó testfolyadékjában van szuszpendálva, és onnan hagyományos módon lehet elkülöníteni vagy tisztítani, pl. kromatográfiával (ioncserelő gyanítás, affinitásos, gél-permeációs kromatográfia), centrifugálással, extrahálással és hasonlókkal.

Amikor a selyemhernyót megőröljük és valamilyen oldószerrel összekeverjük [pl. vizes SDS (nátrium-dodecil-szulfát) oldat, vizes karbamid-oldat, vizes alkáli-oldat és hasonló], vagy ilyen oldószer jelenlétében őröljük meg, a fúziós fehérjét el lehet különíteni vagy meg lehet tisztítani az oldatból fentebb leírt módon. Amikor a fúziós fehérjét el kell hasítani, a hasítási/bontási folyamatot olyan módon lehet végrehajtani, amint ezt a korábbiakban leírtuk.

A következő példákat, amelyekben inzulin-szerű növekedési faktorok (IGF-I és IGF-II) és α -interferon a kívánt fehérjék, abból a célból nyújtjuk, hogy részletesebben mutassuk be a jelen találmányt. Meg kell jegyezni azonban, hogy ezeknek a példákknak semmi képpen sem az a célja, hogy korlátozzák a találmány oltalmi körét. A plazmid megalkotásához szolgáló vázlatokat az 1-6. ábrák körvonalazzák. Hacsak másképpen nem jelezzük, a DNS szekvencia 5' („felfelé”) oldalát mutatjuk a bal oldalon és a 3' („lefelé”) oldalát a jobb oldalon a hagyományos gyakorlatnak megfelelően. A 7. ábrán az előállított fehérje gélelektroforetikus képét mutatja. (A – markerek; B – VIGF-IF086-tal; C – BmNPV-T3-mal fertőzött rovar testfolyadék.)

A poliédres fehérje gén, a kívánt fehérje génjei és a fúziós fehérje génjei szintézisét, hasítását, kiválasztását és egyéb kezeléseit az 1. irodalmi hivatkozásban leírt technikákat alkalmazva lehet végrehajtani, valamint a hagyományos módok szerinti génmanipulációs technikákat alkalmazva (lásd a 18. és 19. irodalmi hivatkozásokat).

1. példa

A. A polihedrin génből származó plazmid megalkotása (1. ábra)

A pBmE36 plazmidot (1. irodalmi hivatkozás) EcoRI-gyel hasítjuk és a hasítási terméket tompavégűvé tesszük DNS polimeráz I-et (Klenow-fragmens) alkalmazva a dNTP-k (a négy dezoxinukleozid trifoszfát fajta) jelenlétében. pBmE36 plazmidot (30 μ g DNS) és 10 E HindIII enzimet 200 μ l sóoldattal [50 mM trisz-HCl (pH 7,5) 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT (ditio-treitol) és 100 mM NaCl] elegyítünk, és a reakciót 10 percen át 37 °C hőmérsékleten vízfürdőn végezzük. A HindIII-mal végzett részleges emésztés, amelyet agaróz-gélelektroforézis követ, egy polihedrin gén-tartalmú fragmenst ad. T4 ligázt alkalmazva ezt a fragmenst pUC9 fragmenssel ligáljuk, amelyet előzőleg pUC9 (amely a Pharmacia P-L Biochemicals-nál kapható) EcoRI-gyel végzett hasításával, a hasítási termék tompavégűvé tételével Klenow-fragmenst alkalmazva, és HindIII-mal végzett további

hasításával készítettünk el, hogy egy ligációs terméket nyerjünk. A nyert ligációs terméket alkalmazzuk *Escherichia coli* K12JM83 FERM BP-813 transzformálására. A plazmidot ezután kinyerjük és p9BmE36-nak nevezzük el (a fenti módszer a 19. irodalmi hivatkozásban van leírva).

Egy EcoRV felismerő helyet és egy AatI felismerő helyet vezetünk be a p9BmE36-ba az ATG iniciációs kodon helyénél, illetve a TAA terminációs kodon helyénél, in vitro mutagenézissel (14. irodalmi hivatkozás). Így a p9BmE36-ot DN-ázI-gyel kezeljük etidium-bromid jelenlétében, hogy egy bemetszett („nicked”) plazmidot nyerjünk (14. irodalmi hivatkozás), amelyet azután összeforrasztunk a következő két, kémiai szintetizált DNS fragmenssel:

ACCTATAGATATCCCGAATTA (21-mer) és

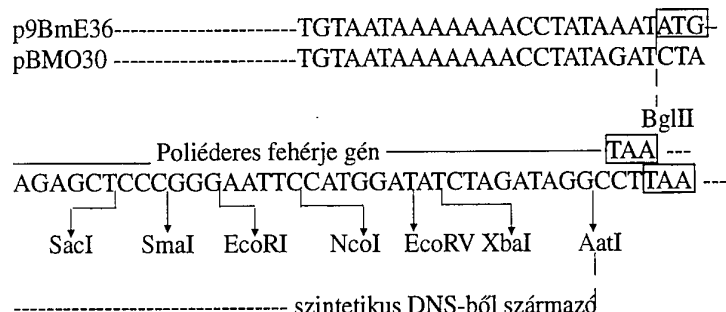
EcoRI

GGTCCGGCGTAGGCCTTAAACAC (24-mer)

AatI

A fragmenseket szilárdfázisú foszfoamitid-módszerrel kémiai úton szintetizáljuk 380 DNS Synthesizerrel (Applied Biosystems Corp.) alkalmazva, Matteucci és Caruthers, 1981, „Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support”, J. Am. Chem., 24: 3185–3191. módszerét alkalmazva.

A polimeráz I-gyel és T4 ligázal végzett ezt követő kezelés egy heteroduplex plazmidot ad, amelyet



B. Részben hiányos poliédres génnel rendelkező plazmid megalkotása (2. ábra)

A p9H18 plazmidot (1. irodalmi hivatkozás) EcoRI-gyel elhasítjuk, majd Bal31-gyel kezeljük, hogy ilyen módon a hasítási helyek valamelyik oldalának egy részét levágjuk. A Bal31-es kezelés idejét változtatva hosszában eltérő fragmenseket állítunk elő. Ezeket a fragmenseket HindIII-mal kezeljük és 0,7%-os agaróz gélen elkülönítjük, amely műveletet extrahálás követ, amely különböző hosszában eltérő, vírus-eredetű DNS fragmenseket ad.

A pUC9 plazmidot SmaI-gyel és HindIII-mal kezeljük, ezt követi a ligálás az előzőleg nyert DNS fragmensekkel (amelyek egy tompa véggel és egy HindIII véggel rendelkeznek). Az így előállított plazmidot alkalmazva *Escherichia coli* K-12JM83-at transzformálunk, majd növesztünk. A plazmidot kinyerjük, és a bázisszekvenciát az egyes vírus-eredetű beiktatott DNS fragmensek 3'

azután *Escherichia coli* K-12JM83 transzformálásához alkalmazzuk. A transzformálást ismét egy kívánt mutáns nyerése érdekében végezzük. Így a p9BmM36 plazmidot nyerjük.

A poliédres gén eltüntetéséhez a p9BmM36-ból, és a polilinker beiktatásához a következő két DNS fragmenst (mindegyik 38-mer) szintetizáljuk kémiai lag:

CTAAGAGCTCCCGGGAATTCCATGGATATCTA-GATAGG és
CCTATCTAGATATCCATGGAATTCCCGG-GAGCTCTTAG.

Ez a két fragmens komplementer egymással és rendelkeznek SacI, SmaI, EcoRI, NcoI, EcoRV és XbaI felismerő helyekkel.

A fenti két fragmenst foszforilezzük a megfelelő 5' végén T4 kinázt alkalmazva, majd egymással összeforrasztjuk. Az összeforrasztott terméket ligáljuk, T4 ligáz jelenlétében, egy poliédres génnel frágmenssel, amelyet p9BmM36-nak EcoRV-vel és AatI-gyel végzett hasításával nyertünk. Ez a művelet egy BglII felismerő hely és egy AatI felismerő hely képződését eredményezi a kapcsoló 5' oldalán, illetve 3' oldalán. Az így létrejött plazmidot használjuk *Escherichia coli* K-12JM83 transzformálására, majd kinyerjük és pBMO30-nak nevezzük el.

A pBMO30 polilinker részének DNS szekvenciáját, és a rajta levő hasítási helyeket az alábbiakban mutatjuk be, szembeállítva a p9BmE36 poliédres gén részével.

oldaláról meghatározzuk a didezoxi módszerrel (15. irodalmi hivatkozás) egy primert alkalmazva (az M13-hoz szolgáló 15 bázisos szekvenáló primer), hogy ezáltal azonosítsuk a vírus-eredetű poliédres gén részt. Így a poliédres fehérje aminosav-szekvenciájának megfelelő bázisszekvenciát [amint ezt Serebryani és munkatársai (16. irodalmi hivatkozás) leírták] megtaláljuk a vírus-eredetű DNS fragmensek bázis-szekvenciái között. Az ATG transzlációs start kodont és a TAA terminációs kodont szintén azonosítjuk. A különböző plazmidok közül (p9B plazmid-sorozat), amelyeket a Bal31 kezelés időinek hosszától függően nyerünk, a 212 bp-s, 338 bp-s, 662 bp-s és 727 bps-s (az ATG transzlációs rajt kodontól lefelé számítva) plazmidokat, amelyek nélkülözik a poliédres gént, p9B240-nek, illetve p9B120-nak, illetve p9B118-nak, illetve p9B086-nak nevezzük. A poliédres gének a hossza 738 bp, beleértve a TAA stop kodont is.

ATGCCGAATT ATTCATACAC CCCCACCATC GGGCGTACTT
 ACGTGTCGA CAATAAATAT TACAAAACT TGGGCTGTCT
 TATCAAAAAC GCCAAGCGCA AGAAGCACCT AGTCGAACAT
 GAACAAGAGG AGAAGCAATG GGATCTTCTA GACAACTACA
 TGGTTGCGCA AGATCCCTTT TTAGGACCGG GCAAAAACCA
 AAAACTTACC CTTTTTAAAG AAATTCGCAG TGTGAAACCC
 p9b240 ←
 GATACCATGA AGTTAATCGT CAACTGGAGC GGCAAAGAGT
 TTTTGCGTGA AACTTGGACC CGTTTTGTG AGGACAGOTT
 CCCCATTTGTA AACGACCAAG AGGTGATGGA CGTGTACCTC
 p9b120 ←
 GTCGCCAACC TCAAACCCAC ACGCCCCAAC AGGTGCTACA
 AGTTCCCTCGC TCAACACGCT CTTAGGTGGG AAGAAGACTA
 CGTGCCCCAC GAAGTAATCA GAATTATGGA GCCATCCTAC
 GTGGGCATGA ACAACGAATA CAGAATTAGT CTGGCTAAAA
 AGGGCGGCGG CTGCCCAATC ATGAACATCC ACAGCGAGTA
 CACCAACTCG TTCGAGTCGT TTGTGAACCG CGTCATATGG
 GAGAACTTCT ACAAAACCAT CGTTTACATC GGCACAGACT
 CTGCCGAAGA AGAGGAAATC CTAATTGAGG TTTCTCTCGT
 p9B115 ←
 TTTCAAATA AAGGAGTTTG CACCAGACGC GCCTCTGTTC
 ACTGGTCCGG CGTATTAA
 p9B086 ←

C. Az α -interferonból és poliéderez fehérjéből összeállított fúziós fehérjéhez tartozó gén megalkotása (3. ábra)

A pIFN2B310-et (1. irodalmi hivatkozás) SmaI-lyel elhasítjuk, és egy α -IFN-J fragmenst izolálunk agaróz gél-elektroforézissel, T. Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) 164. oldalán leírtak szerint. Ezt ligáljuk SmaI-lyel hasított pBM030-cal, T4 ligázt alkalmazva, és az így létrejött plazmidot használjuk Escherichia coli K-12JM83 transzformálásához. A rekombinációs plazmidot pBT310-nek jelöljük, miután szekvenálással igazoljuk, hogy ez rendelkezik az α -IFN-J génnel, a helyes irányban beiktatva.

A pBT310-et BglIII-vel elhasítjuk és a hasítási

A kapcsoló rész DNS szekvenciája:

086 ←
 Poliéderezin gén --- GGT-GGG-GAT-CTA-AGA-GCT-CCC-GGG-ATG-GCC---(α -IFN-J)
 Met-Ala---

D. Az IGF-I-ből és poliéderez fehérjéből összeállított fúziós fehérjéhez tartozó gén megalkotása (4. ábra)

A pIGF001 plazmidot kinyerjük az Escherichia coli K12 MC1061-ből (FERM BP-932) és SalI-lyel hasítjuk. A hasított terméket tompavégűvé tesszük Klenow-fragmenssel a dNTP-k jelenlétében, és AvaII-vel hasítjuk, és egy IGF-I géntartalmú fragmenst izolálunk poliakrilamid gél elektroforézissel.

Külön pBM030-at hasítunk EcorV-tel és SacI-lyel.

Úgy tűnik, hogy az Ile-Glu-Gly-Arg aminosav szekvenciát be kell vezetni, a poliéderez fehérje és az IGF-I között a fúziós fehérjetermelésben úgy, hogy a fúziós fehérjét az Xa vér-koagulációs faktor (F-Xa) fel tudja ismerni és el tudja hasítani. Ebből a célból a

25 terméket tompavégűvé tesszük, Klenow fragmenst alkalmazva a dNTP-k jelenlétében, majd ScaI-lyel hasítjuk. Egy α -IFN-J gén-tartalmú fragmenst izolálunk agaróz gél elektroforézissel. Maniatis Genti módszerével.

30 p9B086-ot elhasítunk EcoRI-lyel és ScaI-lyel, és egy poliéderezin géntartalmú fragmenst izolálunk agaróz gél elektroforézissel. Ezt a fragmenst tompavégűvé tesszük S1 nukleázt alkalmazva, és a fent említett, α -IFN-J géntartalmú fragmenshez ligáljuk T4 ligázt alkalmazva. Escherichia coli K-12JM83-at transzformálunk az így létrejött plazmiddal. Ezután igazoljuk didezoxi-módszerrel, hogy a kapcsoló rész DNS szekvenciája az így nyert plazmidban helyes. A plazmidot pIFN086-nak nevezzük el.

40

következő DNS fragmenseket szintetizáljuk kémiai-
lag.

ATTGAAGGCAGAG (13-mer) és

GACCTCTGCCTTCAATAGCT (20-mer).

50 Ez a két fragmens komplementer egymással és összeforrasztás után, a „felfelé” oldalon, képez egy SacI hasítási véggel kapcsolható, kohezív véget, és a „lefelé” oldalon egy AvaII hasítási véggel kapcsolható, kohezív véget.

55 Ezt a két fragmenst foszforilezzük mindkét 5' vég-nél, T4 kinázt alkalmazva, majd összeforrasztjuk ezeket. Az összeforrasztott terméket, a fentebb említett IGF-I fragmenst és a fentebb említett hasított pBM030-at ligáljuk egymással, T4 ligázt alkalmazva.
 60 Escherichia coli K-12JM83-at transzformálunk a ligá-

lási termékkel, hogy egy plazmidot állítsunk elő. A didezoxi módszerrel végzett DNS szekvencia elemzés igazolja, hogy a kapcsolás az F-Xa felismerési hely és az IGF-I gén között ebben a plazmidban (pIGF-I030) korrekt. A pIGF-I030-at BglIII-val hasítjuk, majd tompavégűvé tesszük Klenow-fragmenst alkalmazva a dNTP-k jelenlétében, és ScaI-gyel hasítjuk, és egy IGF-I géntartalmú fragmenst izolálunk agaróz gél elektroforézissel.

p9B0086-ot külön hasítunk EcoRI-gyel és ScaI-gyel és tompavégűvé tesszük S1 nukleáz alkalmazva, és egy polihedrin géntartalmú fragmenst izolálunk Maniatis módszerével agaróz gél elektroforézissel és ligáljuk a fentebb említett IGF-I gén-tartalmú fragmenssel T4 ligáz alkalmazva. Az így létrejött plazmidot alkalmazva, Escherichia coli K-12JM83-at transzformálunk és egy olyan plazmidot nyerünk, amely korrekt ligációval előállított fúziós fehérje gént tartalmaz, ezt pIGF-IF086-nak nevezzük. A kapcsoló rész DNS szekvenciáját az alábbiakban mutatjuk be.

—Polihedrin gén—GGTGGGGATCTAAGAGCT-
ATT-GAA-GGC-AGA-GGT-CCA-GAA-ACC-TTI
Ile-Glu-Gly-Arg-Gly-Pro-Glu-Thr-Leu-
F-Xa IGF-I

E. Az IGF-II-ből és különböző hosszúságú poliédere fehérjéből összeállított fúziós fehérjék génjeinek megalkotása (5. ábra)

A pIGF002 plazmidot Escherichia coli K12 MC1061 IGF002-ből (FERM BP-933) kinyerjük, részlegesen emésztjük SalI-gyel, az alábbiak szerint: pIGF-II030 plazmidot (30 µg DNS) és 10E SalI enzimet 200 µl sóoldattal [50 mM trisz-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂ 1 mM DTT (ditio-treitol) és 100 mM NaCl] elegyítünk, és a reakciót 10 percen át 37 °C hőmérsékleten vízfürdőn végezzük. Ezután a terméket tompavégűvé tesszük Klenow-fragmenst alkalmazva a dNTP-k jelenlétében, majd HaeIII-mal hasítjuk, ezt követően poliakrilamid gél-elektroforézisnek vetjük alá, ezáltal egy IGF-II géntartalmú fragmenst izolálunk Maniatis módszerével (kiválasztása szekvenálással). Ezt a fragmenst ligáljuk SmaI-gyel hasított pBM030-cal T4 ligáz alkalmazva, és a ligálási keveréket Escherichia coli K-12JM83 transzformálására használjuk fel. Az így nyert transzformánsoknál a transzformánsról igazoljuk, hogy hordoz egy olyan plazmidot (pIGF-II030), amely IGF-II génnel rendelkezik a korrekt irányban beleiktatva.

A pIGF-II030-at részlegesen emésztjük EcoRI-gyel, az alábbiak szerint: pIGF-II030 plazmidot (20 µg DNS) és 8E EcoRI enzimet 200 µl sóoldattal [10 mM trisz-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT és 50 mM NaCl] elegyítünk, és a reakciót 10 percen át 37 °C hőmérsékleten vízfürdőn végezzük. A terméket ScaI-gyel hasítjuk, és egy IGF-II géntartalmú fragmenst (meghatározás szekvenálással) izolálunk agaróz gélelektroforézissel. Ezt a fragmenst ligáljuk T4 ligáz jelenlétében egy olyan fragmenssel, amely a polihedrin gén egy részét tartalmazza, ezt agaróz gélelektroforé-

zissel izoláljuk a p9B240-nek, p9B120-nak vagy a p9B115-nek EcoRI-vel és ScaI-gyel végzett hasítása után.

Escherichia coli K-12JM83-at transzformálunk az így létrejött plazmidokkal. A DNS szekvencia-elemzése a didezoxi-módszerrel igazolja, hogy az így létrejött transzformánsokból nyert plazmidok rendelkeznek a fúziós fehérje helyes úton megalkotott génjeivel.

Ezeket a plazmidokat pIGF-IIF240-nek, illetve pIGF-IIF120-nak, illetve pIGF-IIF115-nek nevezzük.

A kapcsoló rész DNS szekvenciáját az egyes DNS szekvenciákban az alábbiakban mutatjuk be:

pIGF-IIF240
-ACCCGGGAATTC-ATG-GCT-----
240 Met-Ala---IGF-II
pIGF-IIF120
-GACCGGGAATTC-ATG-GCT-----
120 Met-Ala---IGF-II
pIGF-IIF115
-ATCCGGGAATTC-ATG-GCT-----
115 Met-Ala---IGD-II

2. példa

Bm sejtek átfertőzése

A BmNPV T3 törzs vírus DNS-t (ATCC 40188) és pIFNF086-ot – 1:100 molarányban – összekeverünk az I. és II. oldatokkal, amelyek összetétele a következő:

I.	
Desztillált víz	2,1 µl
Hordozó DNS (lazac here DNS, 1 mg/ml)	50 µl
BmNPV DNS	10 µl
pIFNF086 DNS	50 µg
2 mól/l-es CaCl ₂	300 µg
II.	
50 mmól/l-es HEPES puffer, amely 0,28 mól/l nátrium-kloridot is tartalmaz	2,5 µl
Foszfát-puffer (35 mmól/l Na ₂ HPO ₄ – 35 mmól/l NaH ₂ PO ₄)	50 µl

Az így létrejött szuszpenzió 1 ml-es részletét hozzáadjuk 4 ml Bm sejtenyészítő tápközeghez (TC-10 tápközeg, amely még 10% borjúembrió-szérumot is tartalmaz, lásd 17. irodalmi hivatkozás), és a keveréke hozzáadjuk Bm sejtekhez (ATCC CRL-8910) (2×1 000 000 sejt), hogy ezáltal bevezessük a fenti DNS-t a Bm sejtekbe. Húsz órával később a tápközeget friss adaggal cseréljük fel. További 5 napos inkubálás után a tápközeget kinyerjük és centrifugáljuk, és a felülúszót tarfolt-vizsgálatnak (lásd 11. irodalmi hivatkozás) vetjük alá, ezáltal a rekombináns vírust klónként kinyerjük. Ezt vIFN086-nak nevezzük.

A vIGF-IF086, vIGF-IIF240, vIGF-IIF120 és vIGF-IIF115 rekombináns klónokat hasonlóképpen nyerjük, a pIGF-IF086-ot, illetve pIGF-IIF240-et, illetve pIGF-IIF120-at, illetve pIGF-IIF115-öt alkalmazva.

3. példa

A fúziós fehérje kifejlesztése Bm sejtekben

Bm sejteket (ATCC CRL 8910) (2×10⁶ sejt) fertő-

zünk VIFN086-tal olyan módon, hogy vIFN086 szuszpenziót (5×10^7 pfu) adunk hozzá. Harminc perccel később a felülúszót eldobjuk, és 4,5 ml-nyi adagban friss tápközeget adunk hozzá, és az inkubálást tovább folytatjuk 25°C hőmérsékleten 4 napon át. Ezután a tenyészetet centrifugáljuk (1000 fordulat/perc, 10 perc), hogy csapadékot kapjunk. 500 µl-nyi adagban friss tápközeget adunk hozzá, és öt fagyasztás-felengedetési ciklus után a keveréket centrifugáljuk (15 000 fordulat/perc, 10 perc). Az így összegyűjtött csapadékhoz 200 µl 4%-os nátrium-dodecil szulfát (SDS) – 10%-os merkaptó-etanol keveréket adunk. Az így létrejött keverék egy 5 µl-es részletét használjuk mintaként az SDS–14% akrilamid-gél elektroforézishez.

Elektroforézis után egy, a fúziós fehérjének megfelelő csíkot figyelünk meg a gélen. Ezért a csík sűrűségét megmérjük denzitométerrel és összehasonlítjuk az egyes jelzők sűrűségével (mindegyik jelző csík 1 µg fehérjét tartalmaz). Az így becsült kitermelés 0,3 mg/l sejtenyészet-lé, az először nyert sejtenyészetre vonatkozóan. Mivel az IFN rész mintegy 40%-ot tesz ki a fúziós fehérjében molekulatömegre számítva, ez a kitermelés értelemszerűen 0,12 mg/ml IFN-nek felel meg sikeres elhasítás és IFN kinyerés után. Ez a kitermelés több, mint hússzor nagyobb, mint az 5×10^6 egység/ml érték (amely 0,005 mg/ml-nek felel meg), amit egy beszámolóban adtak meg, az IFN-nek Bombyx mori sejtekben való kifejeződésére (1. irodalmi hivatkozás).

A vIGF–IF086-tal, vIGF–IIF240-nel, vIGF–IIF120-szal és vIGF–IIF115-tel fertőzött Bm sejtek által termelt fúziós fehérje kitermelése, amint ezt a fentebb leírt módon mérjük, 0,5 mg, illetve 0,1 mg, illetve 0,4 mg, illetve 0,5 mg/ml sejtenyészet-lé, vagy az ezekben a fúziós fehérjékben levő IGF–I vagy IGF–II mennyiségében kifejezve, 0,1 mg/ml, illetve 0,05 mg/ml, illetve 0,1 mg/ml, illetve 0,1 mg/ml.

4. példa

A. Fúziós fehérjék kifejezése Bm sejtekben

Bm sejteket (ATCC CRL 8910) (2×10^6 sejt) fertőzünk vIGF–IIF120-szal, olyan módon, hogy vIGF–IIF120 szuszpenziót (5×10^7 pfu) adunk hozzá. Harminc perccel később a vírust eltávolítjuk, 4,5 ml-es adag friss tápközeget adunk hozzá, az inkubálást folytatjuk 25°C hőmérsékleten 4 napon át, és a tenyészetet centrifugáljuk (1000 fordulat/perc, 10 perc). Az így összegyűjtött csapadékhoz 500 µl friss tápközeget adunk. Fagyasztás-felengedetési ciklus ötszöri ismétlése után a keveréket centrifugáljuk (15 000 fordulat/perc, 10 perc), hogy csapadékot nyerjünk. Ezt a csapadékot desztillált vízzel mossuk, 0,5%-os SDS-ben feloldjuk és nagy teljesítményű folyadékkromatográfiának vetjük alá [HPLC: TSK Gel Phenyl 5PWRP (gyártó: Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.); oldószerrendszer: 0,1% trifluor-ecetsav – 20–75% acetonitril, lineáris koncentráció gradienssel]. Így 2 ml-es, a fúziós fehérjét tartalmazó frakciót gyűjtünk.

B. Hasítás cianogén-bromiddal

Ehhez a frakcióhoz 50 µl 1%-os SDS-t adunk, a

keveréket szárazra koncentrálnak és a koncentrált anyagot 50 µl desztillált vízben feloldjuk. Az oldat egy 15 µl-es adagjához 35 µl hangyasavat adunk és 45 µl 70%-os hangyasavat, ezt követi 5 µl cianogén-bromid oldat (200 µmol/ml), 70%-os hangyasavban, hozzáadása. A szobahőmérsékleten végzett reakció 24 órája után a reakciókeveréket szárazra koncentrálnak, a koncentrált anyagot feloldjuk 7,5 µl desztillált vízben és az oldatot elektroforézisnek vetjük alá, amelynek során IGF–II-nek megfelelő csíkot észlelünk.

Így SDS – 16% poliakrilamid gél elektroforézis során, a vIGF–IIF120-szal fertőzött Bm sejtek vizes SDS oldattal végzett extrahálásával és az ezt követő, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával végzett részletes tisztítással nyert frakció egy mintegy 23 kD-s csíkot ad, amely a poliédes fehérje (egy részéből) és IGF–II-ből álló fúziós fehérjének felel meg, míg a cianogén-bromid bontási termék egy mintegy 7 kD-s csíkot mutat, amely az IGF–II-nek felel meg, számos 10–14 kD-s kötással együtt, amelyek valószínűleg a poliédes fehérje bomlási termékeinek tulajdoníthatók (lásd 8. ábra, ahol A jelenti a jelzőket, B a fúziós fehérjét és C a cianogén-bromidos bomlási terméket).

C. Az IGF–IP N-terminálisának meghatározása

Hasonló módon, amint fentebb leírtuk, mintegy 20 mg fúziós fehérjét nyerünk 50 ml, vIGF–IIF120-szal fertőzött Bm sejtenyészetből és a fúziós fehérjét cianogén-bromiddal elhasítjuk és a reakciókeveréket koncentrálnak.

A koncentrált anyagot feloldjuk 5 ml 200 mmol/l-teres piridin-ecetsav pufferban (pH 3,0), és az oldatot oszlopkromatográfiának vetjük alá [SP-Toyopearl (gyártó: Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.); oldószerrendszer: 200 mol/l piridin-ecetsav puffer (pH 3,0)–2,0 mol/l piridin-ecetsav puffer (pH 5,0), lineáris koncentráció gradienssel]. Így egy IGF–II-t tartalmazó frakciót gyűjtünk. Ezt a frakciót liofilizálunk, feloldjuk desztillált vízben és nagy teljesítményű folyadékkromatográfiának vetjük alá [HPLC: ODS–120T (gyártó: Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.); oldószerrendszer: 0,1% trifluor-ecetsav – 10–65% acetonitril, lineáris koncentráció-gradienssel]. A nyert tiszta IGF–II-t peptid-szekvencia elemzésnek vetjük alá [470A Protein Sequencer (gyártó: Applied Biosystems)]. Az így bizonyított IGF–II amino-terminális aminosav-szekvenciáját az alábbiakban mutatjuk be. Ala Tyr ARg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser ARg Pro Ala Ser

5. példa

A. A fúziós fehérje kifejeződése Bm sejtekben (6. ábra)

A pIGF001 plazmidot kinyerjük az Escherichia coli K12 MC1061 IGF001-ből (FERM BP–932) és SallI-gyel hasítjuk. A hasítási terméket tompa végűvé tesszük Klenow-fragmenst alkalmazva a dNTP-k jelenlétében és AvaII-vel hasítjuk és egy IGF–I géntartalmú

fragmenst izolálunk poliakrilamid gél elektroforézissel.

Külön hasítunk pIGF-IIF120-at EcoRV-tel és EcoRI-lyel, hogy eltávolítsuk az IGF-II géntartalmú fragmenst.

Úgy tűnik, hogy a Gly-Pro-Ala aminosav-szekvenciát ismételtelen be kell vezetni a poliéderez fehérje

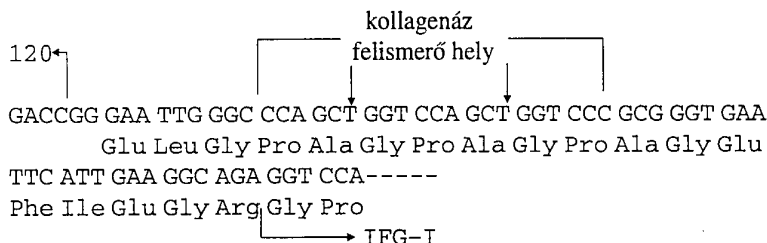
és az IGF-I közé egy fúziós fehérje előállításánál, úgy, hogy a fúziós fehérje felismerhető legyen és hasítható legyen kollagenázzal, amely a Pro-Ama-Gly-Pro aminosav-szekvenciát ismeri fel (Ama: bármilyen aminosav) és az Ama és a Gly között hasít. Erre a célra a következő két DNS fragmenst szintetizáljuk kémiai úton:

AATTGGGCCCCAGCTGGTCCAGCTGGTCCCGCGGGTGAATTCATTGAAGGCAGAG (54-mer)
GACCTCTGCCTTCAATGAATTCACCCGCGGGACCAGCTGGACCAGCTGGGCCC (53-mer)

Ez a két fragmens komplementer egymással és összeforrasztás után, a felfelé menő oldalon, egy EcoRI hasítási véggel kapcsolható kohezív véget képez, és a lefelé menő oldalon, egy AvaII hasítási véggel kapcsolható kohezív véget képez.

Ezt a két fragmenst egyenként foszforilezzük 5' végükénél, T4 kinázt alkalmazva, és összeforrasztjuk egymással. Az összeforrasztott terméket, a fentebb említett IGF-I fragmenst és a fentebb említett hasított

pIGF-IIF120-at ligáljuk egymással T4 ligázt alkalmazva. Escherichia coli K-12JM83-at transzformálunk a ligálási termékkel, hogy egy plazmidot állítsunk elő, ezt pIGF-IF120-nak nevezzük. A didezoxi-módszerrel végzett DNS szekvencia elemzés igazolja, hogy a kapcsolás a kollagenáz felismerési hely és az IGF-I gén között ebben a plazmidban korrek. A kapcsolódó rész DNS szekvenciáját az alábbiakban mutatjuk be:



Hasonló módon, amint ez a 2. példában leírtuk, a vIGF-IF120 rekombináns vírust nyerünk, pIGF-IF120-at használva.

Hasonló módon, amint ezt a 4. példában, az (a) részben leírtuk, Bm sejteket fertőztünk vIGF-IF120-szal és fagyasztás, majd felengedetés után a Bm sejteket összegyűjtjük 50 ml tenyészlezből, a sejteket centrifugáljuk (15 000 fordulat/perc, 10 perc), hogy csapadékot nyerjünk. Ezt a csapadékot feloldjuk 6 mól/literes guanidin hidroklorid oldatban és centrifugáljuk (15 000 fordulat/perc, 5 perc), hogy a maradványokat eltávolítsuk. Az oldatot desztillált vízzel szemben dializáljuk és az így keletkezett csapadékot centrifugálással összegyűjtjük (15 000 fordulat/perc, 10 perc).

B. Hasítás kollagenázzal

Az így nyert csapadékot feloldjuk 800 µl 10 mól/l-es karbamid oldatban, ezt követően 100 µl 200 mmól/l-es kalcium-klorid-oldatot, 200 µl 250 mmól/l-es trisz-hidroklorid puffert (pH 7,4) és 900 µl kollagenáz oldatot (a Sigma Chemical Co. gyártmánya) (1500 egység/ml) adunk hozzá. 2 óráig, 30 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után ezt a keveréket centrifugáljuk (15 000 fordulat/perc, 5 perc), hogy felülúszót gyűjtünk. Ezt a felülúszót ioncserélő kromatográfiának vetjük alá [DEAE-Toyopearl (gyártó: Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.); oldószer-rendszer: 25 mmól/l trisz-hidroklorid puffer (pH 7,4)]. Így olyan frakciót gyűjtünk, amely amino-terminálisánál extra aminosav-

gyökökkel rendelkezik (a továbbiakban ezt „IGF-IP”-nek nevezzük).

C. Az IGF-IP N-terminálisának meghatározása

Az IGF-IP-t tartalmazó frakciót koncentrálnak, és a koncentrált anyagot nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiának vetjük alá [HPLC:RPSC (gyártó: Beckman Co.); oldószer-rendszer: 0,1% trifluor-ecetsav – 10–65% acetonitril, lineáris koncentrációgradienssel]. A nyert tiszta IGF-IP-t peptid szekvencia-elemzésnek vetjük alá [470A Protein Sequencer (gyártó: Applied Biosystems)], és felismerjük, hogy a fúziós fehérje a várt helyen hasadt le a kollagenáz hatására. Az IGF-IP így igazolt amino terminális aminosav-szekvenciáját az alábbiakban mutatjuk be.

Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Phe-Ile-Glu-Gly-Arg-Gly-Pro-Glu-Thr-Leu-Cys-Gly-Ala-Glu-Leu.

6. példa

A polihedrin-IGF-I fúziós fehérje kifejeződése selyemhernyóban (*Bombyx mori*)

Az 5. lárvállapot 1. napjában levő selyemhernyókat (*Bombyx mori*) perkután injektáljuk vIGF-IF086 szuszpenzióval, 0,5 ml/fő (10^7 pfu) dózissal, majd eperfalevelekkel tápláljuk ezeket 25 °C hőmérsékleten 3 napon át. Ezután egy gyűjtő tűt iktatunk be a hasi nyúlványba és a testfolyadékot jéggel hűtött Eppendorf csőben gyűjtjük. A testfolyadékot centrifugáljuk (15 000 fordulat/perc, 10 perc), az

üledéket feloldjuk 200 µl 4% SDS–10% merkaptó-
etanol oldatban és az így létrejött oldat 2 µl-es adag-
ját használjuk mintaként SDS–14% akrilamid-gél
elektroforézishez. A fúziós fehérjének megfelelő csí-
kot megjelöljük a gélen elektroforézis után. Ezért a
csík sűrűségét megmérjük, denzitométert alkal-
mazva és összehasonlítva az egyes jelzők sűrűsé-
gével (minden jelzőcsík 1 µl fehérjét tartalmaz).
Az így becsült kitermelés 5 mg/ml testfolyadék.
(Molekulatömegben alapuló kalkuláció jelzi, hogy
az IGF–I-et 1 mg/ml kitermeléssel lehetne kinyer-
ni az IGF–I elválasztása után ebből a fúziós fehér-
jéből).

Az SDS–14% poliakrilamid gél elektroforézis so-
rán a BmNPV–T3 törzzsel fertőzött selyemhernyókból

IGF–I

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly
---TCGAATTC ATG GGT CCA GAA ACC TTG TGT GGT

Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys
GCT GAA TTG GTT GAC GCT TTG CAA TTC GTT TGT

Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr
GGT GAC AGA GGT TTC TAC TTC AAC AAG CCA ACT

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln
GGT TAC GGA TCC TCT TCC AGA AGA GCT CCA CAA

Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
ACT GGT ATC GTC GAT GAA TGT TGT TTC AGA TCT

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala
TGT GAC TTG AGA AGA TTG GAA ATG TAC TGT GTC

Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala
CCA TTG AAG CCA GCT AAG TCT GCT TAG TCGACTG

IGF–II

Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu
--AATTC ATG GCT TAC AGA CCA TCT GAA ACC TTG

Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe
TGT GGT GGT GAA TTG GTC GAC ACC TTG CAA TTC

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg
GGT TGT GGT GAC AGA GGT TTC TAC TTT TCC AGA

Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly
CCA GCC TCC AGA GTT TCT AGA AGA TCC AGA GGT

Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
ATC GTC GAA GAA TGT TGT TTC AGA TCC TGT GAC

Leu Ala Leu leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro
TTG GCT TTG TTG GAA ACT TAC TGT GCC ACC CCA

Ala Lys Ser Glu
GCC AAG TCC GAA TAG----

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

nyert testfolyadék határozott csíkot ad mintegy 30 kD-
nál, amely a poliédes fehérjének felel meg, míg a
vIGF–IF086-tal fertőzött selyemhernyókból nyert test-
folyadék nem ad semmiféle csíkot, amely a poliédes
fehérjének felelne meg, de mutat egy mintegy 36 kD-s
csíkot, amely a poliédes fehérjéből és az IGF–I-ből
álló fúziós fehérjére jellemző (lásd 7. ábra, ahol A
jelenti a jelzőket, B a vIGF–IF086-tal fertőzött testfo-
lyadékot, és C a BmNPV–T3-mal fertőzött testfolyadé-
kot).

Az IGF–I-hez tartozó szintetikus gén és az IGF-
II-höz tartozó szintetikus gén DNS szekvenciáit,
amelyeket a fenti példákban használunk, az alábbiak-
ban mutatjuk be, a megfelelő aminosav szekvenciák-
kal együtt.

Irodalmi hivatkozások:

- 1.) Nature, 315, 592 (1985)
- 2.) Science, 198, 1056 (1977)
- 3.) 145 289/79 számú japán szabadalmi bejelentés
(OPI) (Az OPI kifejezés a továbbiakban „nem vizsgált,
közzétett bejelentés”-t jelent)
- 4.) 19 092/80 számú japán szabadalmi bejelentés
(OPI)
- 5.) 45 395/80 számú japán szabadalmi bejelentés
(OPI)
- 6.) 104 886/80 számú japán szabadalmi bejelentés
(OPI)
- 7.) 145 221/81 számú japán szabadalmi bejelentés
(OPI)
- 8.) 166 200/81 számú japán szabadalmi bejelentés
(OPI)
- 9.) Nature, 309, 810 (1984)
- 10.) Nature, 285, 456 (1980)
- 11.) J. Seric. Sci. Jpn. 53, 547 (1984)
- 12.) J. Invertebr. Pathol. 29, 304 (1977)
- 13.) Appl. Environ. Microbiol., 44, 227 (1982)
- 14.) Nucleic Acids Res. 9, 3647 (1981)
- 15.) Science, 214, 1205 (1981)
- 16.) J. Invertebr. Pathol. 30, 442 (1977)
- 17.) J. Invertebr. Pathol. 25, 363 (1975)
- 18.) Am. J. Hem. Genet., 31, 531 (1979)
- 19.) Maniatis, T. és munkatársai: Molecular Clo-
ning; Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás fúziós proteint kódoló rekombináns
Bombyx mori központi polihedrális vírus (BmNPV)
előállítására, azzal jellemezve, hogy Bombyx mori sej-
teket vagy rovar BmNPV DNS-sel és egy, 5'→3' sor-
rendben a Bombyx mori központi polihedrális vírus
DNS polihedrális proteint kódoló struktúrgénjét meg-
előző promotor szekvenciát, ugyanennek a struktúrgén-
nek részét vagy egészét, adott esetben egy kapcsoló
bázisszekvenciát, a kívánt, BmNPV-re exogént proteint
kódoló struktúrgént, a kívánt peptid terminátor bázis-
szekvenciáját és a polihedrális proteint kódoló struktúr-
gént követő 3'-bázisszekvenciát tartalmazó plazmával

fertőzünk, a sejteket tenyésztjük, majd a rekombináns BmNPV-t kinyerjük.

2. Eljárás fúziós proteint kódoló plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a Bombyx mori központi polihedrális vírus DNS polihedrális proteint kódoló struktúrgénjét megelőző promoter-szekvenciát, a fenti struktúrgén részét vagy egészét, adott esetben egy kapcsoló bázisszekvenciát, egy kívánt, a BmNPV-re exogén peptidet kódoló struktúrgént, a kívánt peptid terminátor bázisszekvenciáját és a polihedrális proteint kódoló struktúrgént követő 3'-bázisszekvenciát 5'→3' sorrendben összekapcsoljuk és a kapott terméket egy plazmidba építjük.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy exogén peptidet kódoló struktúrgénként interferont kódoló struktúrgént alkalmazunk.

4. Eljárás proteinek előállítására rekombináns BmNPV vírusvektor alkalmazásával *azzal jellemezve*, hogy

- a) egy, a BmNPV polihedrális proteinjét kódoló struktúrgéntől felfelé elhelyezkedő 5'-bázisszekvenciát;
- b) a fenti struktúrgén egészét vagy részét;

c) a kívánt, BmPNV-re exogén proteint kódoló gént, adott esetben egy kapcsoló bázisszekvenciával kapcsolva a polihedrális proteint struktúrgénjéhez,

d) a polihedrális proteint kódoló struktúrgéntől lefelé elhelyezkedő 3' bázisszekvenciát tartalmazó rekombináns BmNPV vírusvektort Bombyx mori sejtekbe vagy rovarba juttatunk és ott szaporítunk, majd a fúziós proteint kinyerjük és a fúziós fehérjéből a kívánt fehérjét kihalásztuk.

5. Eljárás fúziós proteinek előállítására BmNPV vírusvektorok alkalmazásával *azzal jellemezve*, hogy

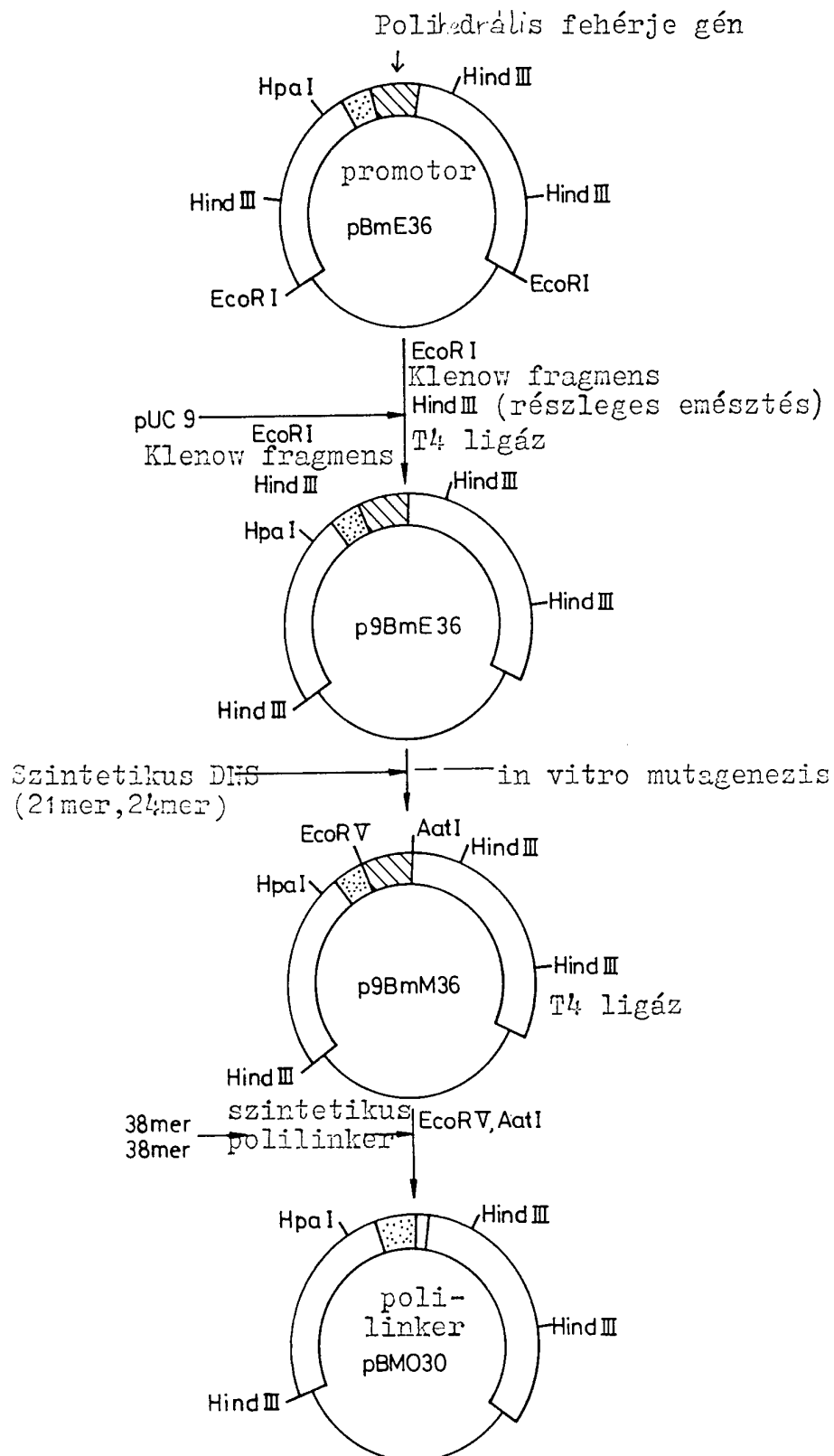
a) egy, a polihedrális proteint kódoló struktúrgéntől felfelé elhelyezkedő 5'-bázisszekvenciát;

b) a fenti struktúrgén egészét vagy részét;

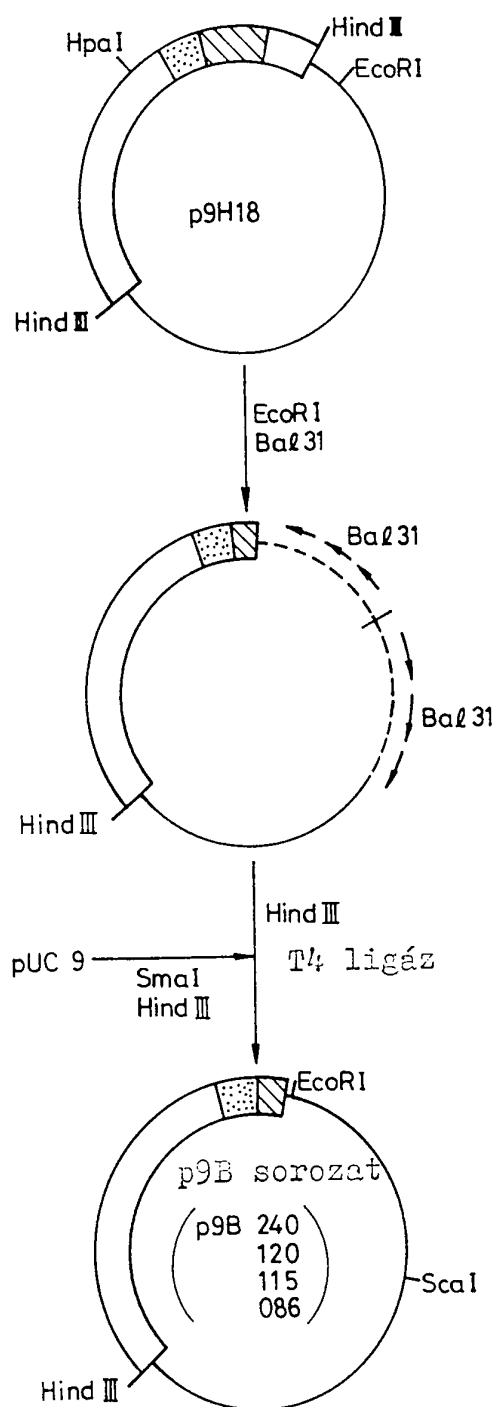
c) a kívánt, BmPNV-re exogén proteint kódoló gént, adott esetben egy kapcsoló bázisszekvenciával kapcsolva a polihedrális proteint struktúrgénjéhez,

d) a polihedrális proteint kódoló struktúrgéntől lefelé elhelyezkedő 3' bázisszekvenciát tartalmazó rekombináns BmNPV vírusvektort Bombyx mori sejtekbe vagy rovarba juttatunk és ott szaporítunk, majd a fúziós proteint kinyerjük.

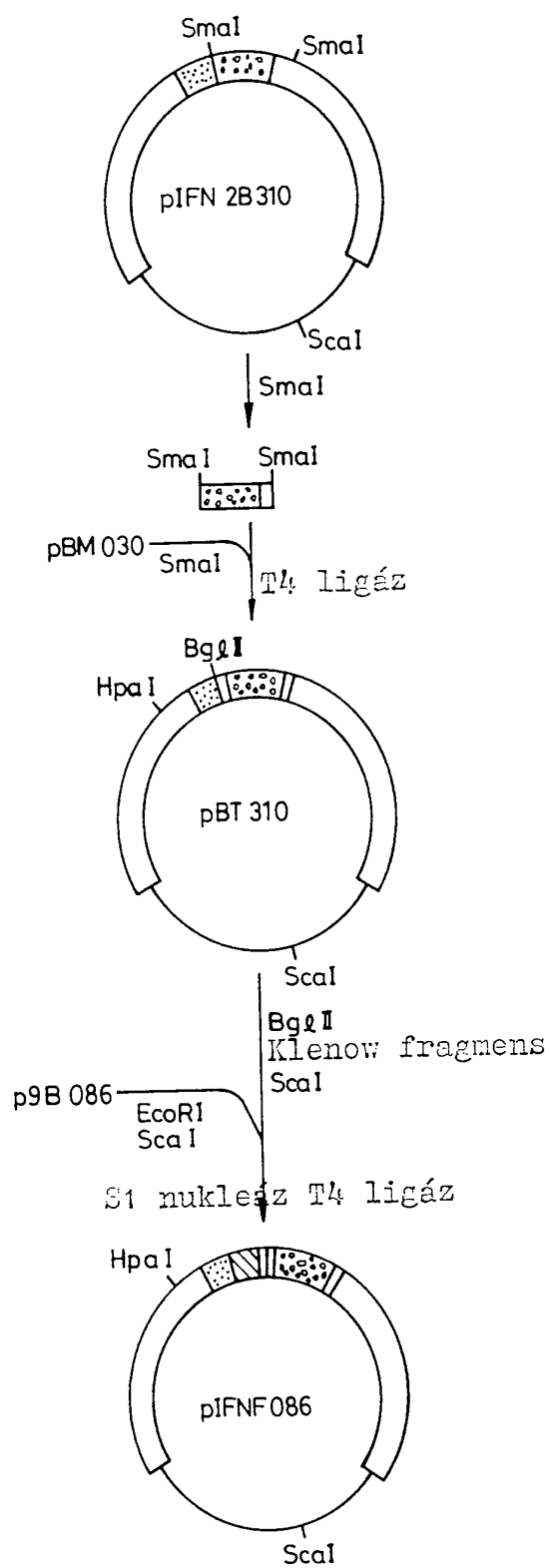
1. ábra



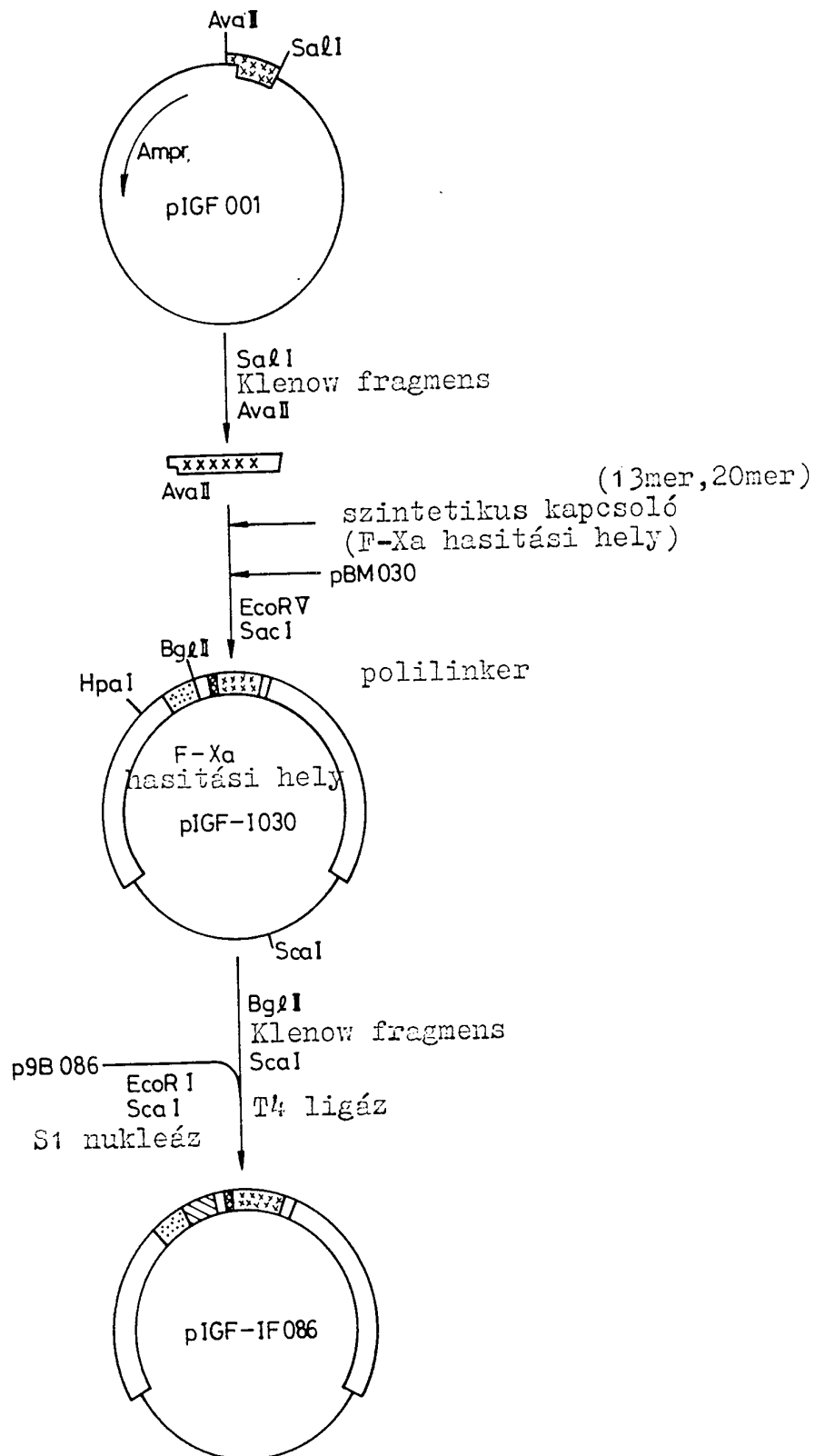
2. ábra



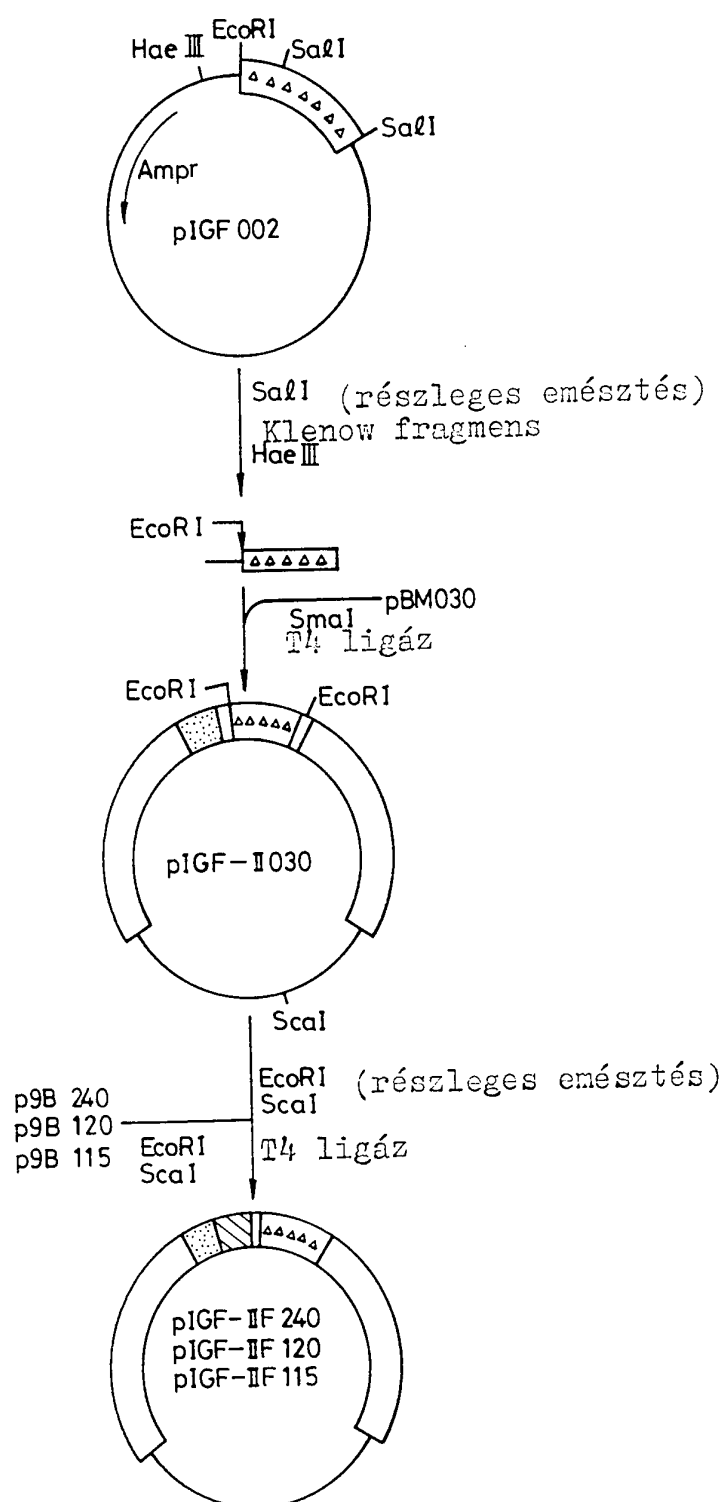
3. ábra



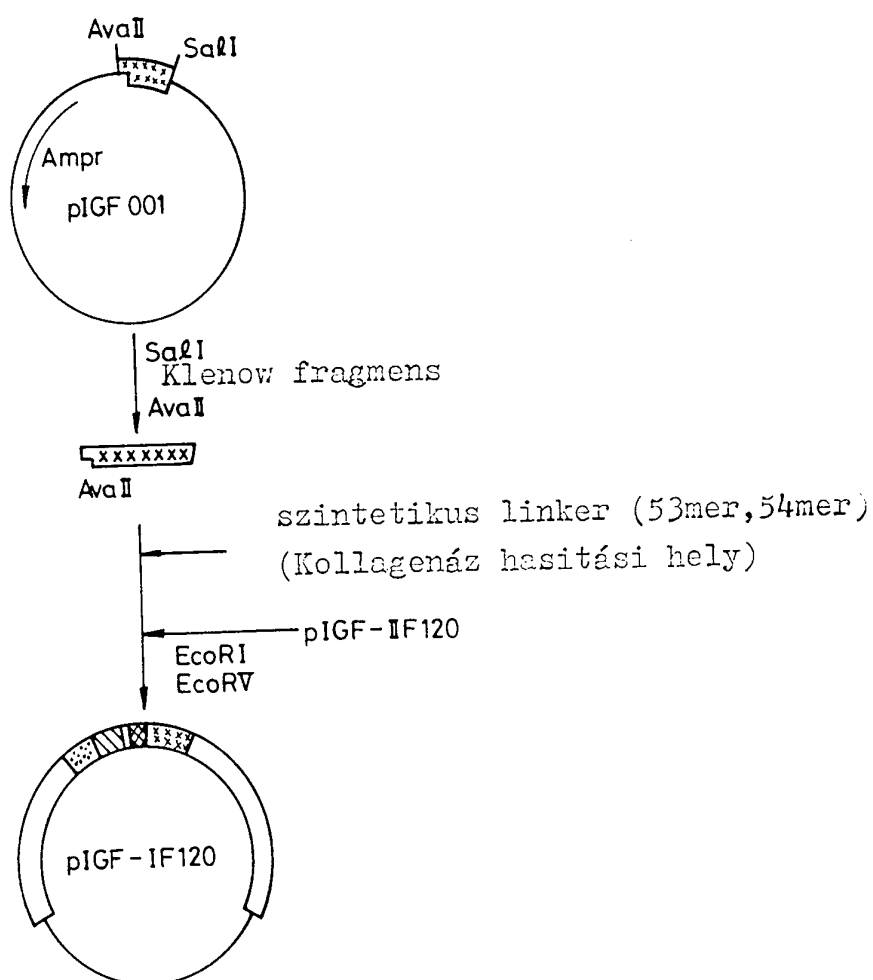
4. ábra



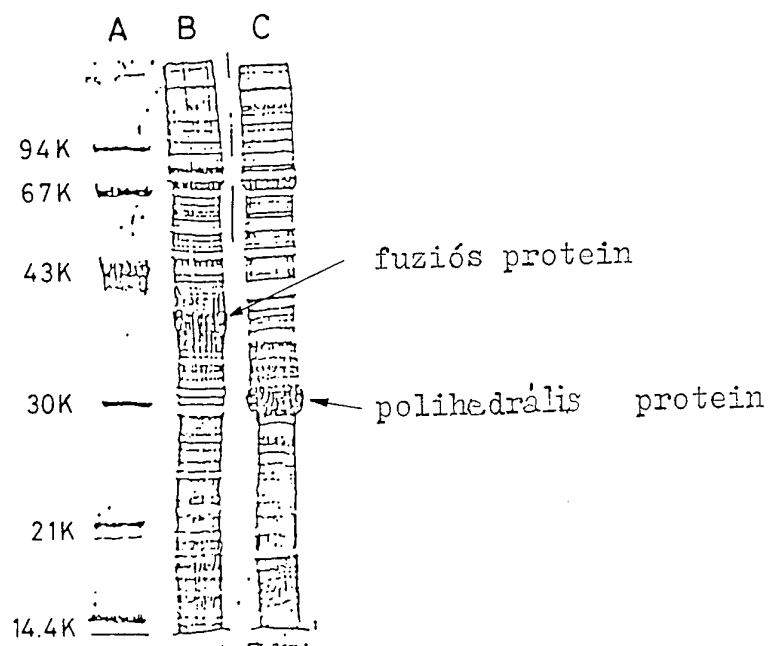
5. ábra



6. ábra



7. ábra



8. ábra

