P0003567

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Amidált polipeptidhormonok prekurzorainak azonosítására szolgáló oligonukleotidok

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezik új oligonukleotidok és próbaként történő alkalmazásuk amidált polipeptidhormonok prekurzorait kódoló mRNS azonosítására és amidált polipeptidhormonok azonosítása. A találmány tárgyát képezik tehát az alábbiakban ismertetett nukleotidszekvenciájú oligonukleotidok, és a hormonok prekurzorainak azonosítására szolgáló eljárás.

Aktaszámunk: 91679-7887/SG

P0003567

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Amidált polipeptidhormonok prekurzorainak azonosítására szolgáló oligonukleotidok

A találmány tárgyát képezik új oligonukleotidok és próbaként történő alkalmazásuk amidált polipeptidhormonok prekurzorait kódoló mRNS azonosítására és amidált polipeptidhormonok azonosítása. A találmány tárgyát képezik tehát az alábbiakban ismertetett nukleotidszekvenciájú oligonukleotidok, és a hormonok prekurzorainak azonosítására szolgáló eljárás.

Az amidált polipeptidhormonok prekurzor formájában szintetizálódnak, amely azután érésen megy keresztül. Ez az érés egy amidálási reakció.

A C-terminális vég amidálási reakciója az amidált polipeptidhormonok jellemző reakciója. Ez a reakció, amely egy vagy több hormon prekurzorán megy végbe, a hormon érését biztosítja, valamint a biológiai stabilitását az élettani közegben: a képződött amidcsoport a szabad savcsoportnál kevésbé támadható. A hormon így jobban ellenáll a

Aktaszámunk: 91679-7887/SG

karboxipeptidázoknak, tovább marad aktív a sejtben és megőrzi optimális affinitását a receptorhelye iránt.

Az amidálást sokan leírták [Bradbury, Alan F. és Smyth, Derek G., "Peptid amidation", TIBS 16, 112-115 (1991); Katopodis, A.G., Ping, D.S., Smith, C.E. és May, S.W., "Functional and structural characterization of peptidylamidoglycolate lyase, the enzyme catalysing the second step in the peptide amidation", Biochemistry 30(25), 6189-6194 (1991)], a mechanizmusa a következő:

1. A hormonprekurzor polipeptidláncát egy endopeptidáz hasítja a két bázikus aminosavnál, amely arginin és/vagy lizin.

2. Ezt követően két hasítás történik karboxipeptidázzal, amelynek eredményeként a kiterjesztett glicin intermedier jön létre.

3. A PAM-enzimnek (peptidil-glicin-α-amidáló-monooxigenáz) két különböző enzimaktivitása van: az egyik a kiterjesztett glicin intermediert alakítja át egy α-hidroxiglicin származékká, a PAM-enzim ebben részt vevő alegysége a PHM (peptidil-glicin-α-hidroxiláló-monooxigenáz). A kapott származék a PAM második alegységének (amelyet PAL-nak neveznek: peptidil-α-hidroxiglicin-α-amidáló-liáz) a szubsztrátja, amely a glicin aminocsoportját köti a közvetlenül az N-terminális vég melletti aminosavon glioxilát felszabadulása közben.

A reakció a hormon vagy hormonok prekurzorán egy felismerőhely jelenlétét igényli, amely felismerőhelyben mindig megtalálható a glicinből és két bázikus aminosavból

álló (arginin vagy lizin) szekvencia [lásd, Katopodis, A.G. és mtsai., Biochemistry 30(25), 6189-6194 (1991), és a fenti hivatkozásokat].

Az endoplazmás retikulumon kívülre szekretálandó amidált polipeptidhormonokról ismert, hogy a polipeptidlánc N-terminális végén egy körülbelül 15-30 aminosavból álló konszenzus szignálszekvenciát tartalmaznak. Ezt később egy szignálpeptidáz-enzim levágja, így a szekretált fehérjében már nem található [lásd, Cuttitta, F., The Anatomical Records 236, 87-93 (1993), és az idézett hivatkozások].

Jelenleg egy új fehérje felismerése nem könnyű. A fehérjék számos technológiával izolálhatók és tisztíthatók: izoelektromos ponton történő kicsapással, bizonyos oldószerekkel történő szelektív extrakcióval és azután kristályosítással történő tisztítással, ellenáramú megoszlatással, adszorpcióval, megosztásos vagy ioncserélő kromatográfiával, elektroforézissel, stb. Ezek a technológiák azonban az izolálandó fehérje tulajdonságairól ismereteket tételeznek fel. Továbbá, ha az érdeklődésre számot tartó, új fehérje tiszta mintája terápiás szinten hozzáférhető, még mindig számos lépcsőn kell keresztülmenni, amíg a szintetizálására képes, genetikailag módosított mikroorganizmus elérhetővé válik.

A találmány szerinti eljárásnak az az előnye, hogy a napjainkig ismert, összes, amidált hormon prekurzorának peptidszekvenciájára jellemző vonások alkalmazásával lehetővé teszi a csoport számos, új hormonjának egyidejű kimutatását. A keresést a prekurzorokat kódoló nukleotid-

szekvenciának olyan szövetekből készített cDNS-bankokban történő közvetlen azonosításával hajtjuk végre, amely szövetekben ezeknek a hormonoknak a prekurzorai szintetizálódhatnak.

Az eljárás szerinti keresés sokkal kevésbé korlátozott, mint a fent említett, hagyományos biokémiai módszerek, mivel:

— ugyanabban a szövetben jelen lévő, számos, különböző prekurzor izolálható ugyanazon az elven,

— ugyanolyan technológiai körülmények között nagyon eltérő biokémiai és biológiai tulajdonságú hormonok prekurzorainak kimutatását teszi lehetővé,

— az ugyanabban a prekurzorban lévő valamennyi peptidhormon egyidejűleg azonosítható.

Ennek eredményeként a találmány jelentős idő- és pénzmegtakarítást eredményez azon a területen, ahol a kutatás és fejlesztés költségei a forgalom igen jelentős részét teszik ki.

A találmány továbbá az emlősök szervezetében alapvető élettani szerepet betöltő aktív hatóanyagok, hormonok, előnyösen amidált polipeptid neurohormonok farmakológiai vizsgálatát is lehetővé teszi. Mivel első ízben válnak hozzáférhetővé aktív hatóanyagoknak megfelelő cDNS-ek, ezek ezután géntechnológiai úton klónozó vektorba vihetők, hogy mikroorganizmusok alkalmazásával a terápiás alkalmazással bíró hormonok szintetizálódjanak.

A találmány tárgyát képezi először egy egyszálú OX-oligonukleotid, amely enyhe („mild") körülmények között

hibridizál egy Y1-Y2-Y3-Y4-Y5 szekvenciájú OY-oligonukleotiddal, amelyben Y1 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Y1 szuppresszálva van, Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 és Y4 jelentése egymástól függetlenül egy, arginint vagy lizint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése egy 1-21 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Y5 szuppresszálva van.

A nukleotid az RNS vagy a DNS nukleozid-foszforsavészter kémiai szerkezetű alapegységét jelenti. A nukleozid egy purinbázisnak (purin, adenin, guanin vagy analógok) vagy egy pirimidinbázisnak (pirimidin, citozin, uracil vagy analógok) ribózzal vagy dezoxiribózzal történő kapcsolódásával jön létre. Az oligonukleotid a nukleotidok polimerje, amely egy láncindító-szekvenciát, egy próbát vagy egy RNS- vagy DNS-fragmenst jelöl.

Az említett oligonukleotidok előállíthatók szintézissel. Egy mintául szolgáló, automatizált eljárást a következő publikációkban közöltek: S.A. Narang, "DNA synthesis", Tetrahedron 39, 3 (1983) és K. Itakura, J.J. Rossi és R.B. Wallace, "Synthesis and use of synthetic oligonukleotides", Annu. Rev. Biochem. 53, 323 (1984).

Előnyösen az OX OY-nal szigorú („sztringens") körülmények között hibridizál.

Előnyösebben az OX hibridizálhat egy Y2-Y3-Y4-Y5 szekvenciájú OY-oligonukleotiddal.

Még előnyösebben az OX hibridizálhat egy Y1-Y2-Y3-Y4 vagy egy Y2-Y3-Y4 szekvenciájú OY-oligonukleotiddal.

Előnyösen az OX hibridizálhat egy olyan OY-oligonukleotiddal, amelyben Y5 jelentése egy Y6-Y7-Y8-Y9 szekvenciájú nukleotidszekvencia, amelyben Y6 jelentése egy szerint, treonint vagy tirozint kódoló nukleotidhármas, Y7 jelentése bármilyen aminosavat kódoló nukleotidhármas, Y8 jelentése glutaminsavat vagy aszparaginsavat kódoló nukleotidhármas és Y9 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia. Még előnyösebben az OX hibridizálhat egy olyan OY-oligonukleotiddal, amelyben Y1 és Y9 szuppresszálva van.

Különösen előnyösen OX hibridizálhat egy olyan OY-oligonukleotiddal, amelyben Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 jelentése egy lizint kódoló nukleotidhármas, Y4 jelentése egy arginint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése egy szerin-alanin-glutaminsavat kódoló három nukleotidhármas-szekvencia.

Ezt a szekvenciát 27 ismert amidálási hely statisztikai vizsgálatának segítségével határoztuk meg, és egy 6 helyzetből álló, adott aminosavmintázat, glicin-lizin-arginin-szerin-alanin-glutaminsav meghatározását eredményezte.

A genetikai kód degenerációja, valamint a glicinnek (4 kodon), az argininnek (6 kodon) és a szerinnek (6 kodon) megfelelő kodonok nagy száma miatt az oligonukleotid-szekvenciát két, ezt a degenerációt figyelembe vevő módszer segítségével készítettük:

— bizonyos helyzetekben inozin, egy olyan nukleotid alkalmazásával, amelyben a hipoxantin nitrogénbázis váloga-

tás nélkül párosodik mind a négy, a DNS-t felépítő nitrogénbázissal,

— bizonyos helyzetekben a beépített nitrogénbázis jellegének változtatásával, így a bevitt különböző bázisok számával arányos számú oligonukleotidkombinációk előállításával.

A találmány tárgyát képezi továbbá az Y1-Y2-Y3-Y4-Y5 szekvenciájú 9-42 nukleotidot tartalmazó OY-oligonukleotid, amelyben Y1 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Y1 szuppresszálva van, Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 és Y4 jelentése egymástól függetlenül arginint vagy lizint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Y5 szuppresszálva van.

Előnyösen a találmány tárgyát képezi egy olyan OY-oligonukleotid, amelyben Y1 szuppresszálva van vagy Y5 szuppresszálva van.

A találmány tárgya előnyösen egy OY-oligonukleotid, amelyben Y5 jelentése egy Y6-Y7-Y8-Y9 szekvenciájú nukleotidszekvencia, amelyben Y6 jelentése egy szerint, treonint vagy tirozint kódoló nukleotidhármas, Y7 jelentése bármilyen aminosavat kódoló nukleotidhármas, Y8 jelentése glutaminsavat vagy aszparaginsavat kódoló nukleotidhármas és Y9 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia.

A találmány tárgya előnyösebben egy olyan OY-oligonukleotid, amelyben Y1 és Y9 szuppresszálva vannak.

A találmány tárgya különösen előnyösen egy olyan OY-oligonukleotid, amelyben Y1 szuppresszálva van, Y2 jelenté-

se egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 jelentése egy lizint kódoló nukleotidhármas, Y4 jelentése egy arginint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése egy szerin-alanin-glutaminsav aminosavakat kódoló három nukleotidhármas-szekvencia.

A találmány tárgyát képezi egy egyszálú OZ-oligonukleotid is, amely 15-39 nukleotidot tartalmaz és hibridizál az amidált polipeptidhormonokra jellemző konszenzus szignálszekvenciával, ahol a szekvencia képlete Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7, amelyben Z1 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Z1 szuppresszálva van, Z2 és Z3 jelentése két, leucint kódoló nukleotidhármas, Z4 és Z5 jelentése két, bármilyen két aminosavat kódoló nukleotidhármas, Z6 jelentése leucint kódoló nukleotidhármas és Z7 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Z7 szuppresszálva van.

A találmányi leírásban a hormon az endokrin rendszer amidált polipeptidhormonjait jelenti, és előnyösebben neurohormonokat.

A konszenzus szignálszekvencia az érésük után a sejt által szekretált fehérjék prekurzoraiban lévő szekvencia.

Végül a találmány tárgyát képezi az OX- vagy OZ-oligonukleotidok csoportja, amely egy kombinatorikus könyvtárat alkot.

A találmányi leírásban a kombinatorikus könyvtár jelentése oligonukleotidok egy olyan csoportja, amelyet aminosavak (amelyek közül néhány változhat) szekvenciáját kódoló nukleotidszekvencia alapján szintetizáltak. A genetikai kód

degenerációja miatt különböző oligonukleotidok csoportját kapjuk.

A találmány tárgyát képezi amidált C-terminális végű peptid prekurzorának azonosítására szolgáló eljárás, amely során a következő egymás után következő lépéseket hajtjuk végre:

1. Egy DNS-bankot készítünk,

2. Egy vagy több OX-oligonukleotidot hibridizálunk a DNS-bankkal,

3. Azonosítjuk a banknak az OX-oligonukleotiddal hibridizáló DNS-szekvenciáját vagy szekvenciáit,

4. Azonosítjuk ebben a szekvenciában vagy szekvenciákban az egy vagy több, feltételezhetően amidált C-terminális végű peptidet.

Előnyös az olyan eljárás, amelyben a DNS-bank cDNS-bank.

Komplementer DNS (cDNS) egy olyan nukleotidlánc, amelynek szekvenciája komplementer az mRNS-ével, az inverz-transzkriptáz által katalizált reakció egyszálú cDNS-t eredményez. Kettős szálú cDNS DNS-polimeráz alkalmazásával nyerhető, és ligáz segítségével plazmidba vagy λ bakteriofág eredetű vektorba építhető.

A cDNS-bank egy adott sejtből kivont citoplazmás mRNS-nek megfelelő cDNS-t tartalmazza. A bankot akkor nevezzük teljesnek, ha minden kiindulási mRNS-re legalább egy bakteriális klón jut.

Hibridizáció akkor jön létre, ha két oligonukleotidnak lényegében komplementer a nukleotidszekvenciája, és hosszuk

mentén kapcsolódni tudnak egymással a komplementer bázisok között hidrogénhidak kialakításával.

Egy olyan eljárás, amelynek során az OX-oligonukleotid egy jelölő anyag, például ^{32}P vagy digoxigenin segítségével kimutatható különösen előnyös.

A nukleotidok radioaktív jelölésére alkalmazott hatóanyagok leggyakrabban β-sugarakat kibocsátó elemek, például ^{3}H, ^{12}C, ^{32}P, ^{33}P és ^{35}S.

Az oligonukleotidok jelölését egy foszfátcsoportnak, amelyet (γ-^{32}P)-ATP szállít, az oligonukleotid 5'-végére történő kapcsolásával hajtjuk végre, amely reakciót a T4-polinukleotid-kináz katalizál. A digoxigeninnel történő jelölés immunoenzimes, a digoxigenint egy nitrogénbázissal kapcsoljuk és az oligonukleotidba építjük. A jelenlétét egy digoxigenin elleni, és alkalikus-foszfatázzal kapcsolt ellenanyag alkalmazásával mutatjuk ki. Az alkalikus-foszfatáz által elhidrolizált szubsztrát révén kifejlődött szín mutatja a jelenlétét.

Más jelölési technológiák is alkalmazhatók: kémiailag úgy módosított oligonukleotidok, hogy egy fém-komplexképző anyagot (lantanida komplexek gyakran használatosak) tartalmaznak, biotin vagy akridin-észtert tartalmazó csoportot, egy fluoreszcens vegyületet (fluoreszcein, rhodamin, Texas red) vagy másokat tartalmaznak.

Az amidált polipeptidhormon prekurzorának azonosítására szolgáló olyan eljárás, amely során a hibridizációs szakaszban az OX-oligonukleotidok kombinatorikus könyvtárát alkalmazzuk különlegesen előnyös.

A találmány tárgyát képezi amidált C-terminális végű peptid prekurzorának azonosítására szolgáló olyan eljárás is, amely a következő lépésekből áll:

1. Egy DNS-bankot készítünk,

2. PCR-módszer alkalmazásával amplifikáljuk az érdeklődésre számot tartó fragmenst az OX-oligonukleotidok egy csoportja és az OZ-oligonukleotidok egy másik csoportja segítségével,

3. Azonosítjuk a bank azon DNS-szekvenciáját, amely hibridizál az OX-oligonukleotiddal és amely a PCR-reakció során amplifikálódott,

4. Azonosítjuk ebben a szekvenciában a feltételezhetően amidált C-terminális végű egy vagy több peptidet.

Az érdeklődésre számot tartó fragmens azt a cDNS-szekvenciát jelenti, amely az egy vagy több amidált polipeptidhormon prekurzorát kódolja.

A DNS PCR-rel ("polymerase chain reaction", polimeráz-láncreakció) történő amplifikációs reakciójához 95°C-ra történő melegítéssel denaturált DNS-készítmény szükséges. A készítményt azután két, az amplifikálandó szekvencia mindkét végén a DNS ellenkező szálain komplementer oligonukleotid feleslegével párosítjuk. Mindegyik oligonukleotid azután láncindítóként szolgál a DNS-polimeráznak (a *Thermus aquatitus* termofil baktériumból kivont Taq-polimeráznak) a DNS mindkét szálának lemásolásához. Ez a ciklus automatizált módon ismételhető egymás követő denaturációk és renaturációk sorozatában.

Számos hivatkozásban részletesen ismertetik a PCR-módszert: US 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159, és 4.965.188 nyilvántartási számú szabadalmi iratok; PCR technology: principles and applications for DNA amplification, szerk.: H. Erlich, kiad.: Stockton Press, New York (1989) és PCR protocols: a guide to methods and applications, szerk.: Innis és mtsai., kiad.: Academic Press, San Diego, California (1990).

Előnyösen a DNS-bank cDNS-bank.

Előnyösebben az OX-oligonukleotid egy jelölő anyag, például ^{32}P vagy digoxigenin segítségével kimutatható.

Egy amidált polipeptidhormon prekurzorának azonosítására szolgáló olyan eljárás, amely az amplifikációs lépésben az OX-oligonukleotidok kombinatorikus könyvtárát és az OZ-oligonukleotidok egy másik kombinatorikus könyvtárát alkalmazza különösen előnyös.

A találmány tárgyát képezi amidált C-terminális végű peptid prekurzorának azonosítására szolgáló eljárás is, amely a következő lépésekből áll:

1. Egy DNS-bankot készítünk,

2. PCR-módszer alkalmazásával amplifikáljuk az érdeklődésre számot tartó fragmenst az OX-oligonukleotidok egy csoportja segítségével,

3. A DNS-bankból azonosítjuk azt a DNS-szekvenciát, amely az OX-oligonukleotiddal hibridizál és a PCR-reakcióban amplifikálódott,

4. Azonosítjuk ebben a szekvenciában a feltehetőleg amidált C-terminális végű egy vagy több peptidet.

Ennek az eljárásnak az a célja, hogy olyan nukleotid-szekvenciákat írjon le, amelyek egynél több amidálási hellyel bíró prekurzorokat kódolnak.

Előnyösen a DNS-bank egy cDNS-bank.

Előnyösebben az OX-oligonukleotid egy jelölő anyag, például ^{32}P vagy digoxigenin segítségével kimutatható.

Egy amidált polipeptidhormon prekurzorának azonosítására szolgáló olyan eljárás, amely az amplifikációs lépésben az OX-oligonukleotidok kombinatorikus könyvtárát alkalmazza különösen előnyös.

A találmány tárgyát képezi amidált C-terminális végű polipeptid prekurzorának azonosítására szolgáló egy másik eljárás, amely a következő lépésekből áll:

1. Egy DNS-bankot készítünk,

2. PCR-módszer alkalmazásával amplifikáljuk az érdeklődésre számot tartó fragmenst egy OX-oligonukleotiddal és egy másik egyszálú oligonukleotiddal, amely enyhe vagy szigorú körülmények között hibridizálni képes egy univerzális konszenzusszekvenciával, amelyet annak a plazmidvektornak a szekvenciája tartalmaz, amelybe a DNS-bank DNS-e klónozva van, például a T3-, T7-, KS-, SK-, M13-, Reverse-lánc-indítók.

3. A DNS-bankból azonosítjuk azt a DNS-szekvenciát, amely egy OX-oligonukleotiddal hibridizál,

4. Azonosítjuk ebben a szekvenciában a feltehetőleg amidált C-terminális végű egy vagy több peptidet.

Az univerzális konszenzusszekvencia egy szekvencia, amely abban a vektorban van, amelyikben a bank DNS-e

klónozva van. Ez a szekvencia szekvenáláshoz láncindítóként szolgálhat. Ezeknek a láncindítóknak a nukleotidszekvenciái megtalálhatók Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular cloning, a laboratory manual, 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) könyvében.

A PCR-reakcióban szükséges, hogy a két oligonukleotid a vektorban klónozott cDNS-hez kötődjön, ahhoz hogy az amplifikáció megtörténjen. Abban az esetben, ha csak egyetlen, az amplifikálandó DNS-fragmenshez tartozó szekvencia ismert, a probléma úgy oldható meg, hogy egy olyan oligonukleotidot alkalmazunk, amely ahhoz a vektorhoz, amelyben a cDNS klónozva van, tartozó nukleotidszekvenciához, például egy univerzális konszenzusszekvenciához hibridizál.

Előnyösen a DNS-bank egy cDNS-bank.

Előnyösen az OY-oligonukleotid egy jelölő anyaggal, például ^{32}P vagy digoxigenin segítségével kimutatható.

Az amplifikációs lépésben OX-oligonukleotidok kombinatorikus könyvtárának alkalmazása még előnyösebb.

A találmány szerinti eljárást egy már izolált hormonon történő alkalmazással bizonyítjuk. A kiválasztott neurohormon a cholecisztokinin (CCK), amely idegi átvivőanyag mennyiségileg túlnyomó részt az agyban található.

1.1 A PCR-reakciókhoz alkalmazott DNS-anyag elkészítése egy kereskedelmi forgalomban beszerezhető bankból, a Lambda Zapp II-ből (patkányagy cDNS-könyvtár vektor, hiv. szám 936 501) a Stratagenetől (Lafolla, USA)

Ez a Stratagene cDNS-bank patkányagy sejtjeinek cDNS-klónjait tartalmazza.

1.1.1 A klónozott DNS felszabadítása Bluescript-fagmidok formájában (Stratagene, Lajolla, USA)

A következő módon végezzük: a cDNS-bankból 250 µl-t, 2 x 10^8 plakképző egység/ml koncentrációban, 200 µl XL_1 kék baktériumot {genotípus: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB $lacI^q$ ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c — lásd Bullock, Fernandez, Short, Biotechniques 5, 376-379 (1987) — optikai denzitás 600 nm-nél: OD = 2,5} és 1 µl, 10^{10} plakképző egység/ml koncentrációjú ExAssist™ fágot [lásd, Hay, B., Short, J., Strategies 5, 16-18 (1992)] 15 percen keresztül 37°C-on kapcsolatba hozunk. Az egész rendszert azután 50 ml LB-tápközegben (összetétel: 10 g nátrium-kloridot, 5 g élesztő kivonatot és 10 g Bactotryptonet 1 liter steril fiziológiás vízben összekeverünk) inkubáljuk 3 órán keresztül 37°C-on kevertetés közben. A tenyésztő táptalajt lecentrifugáljuk és a felülúszót 20 percen keresztül 70°C-on történő melegítéssel aktiváljuk.

1.1.2. A cDNS kinyerése kettős szálú plazmidbank formájában

Ebben a lépésben 15 percen keresztül inkubálunk 37°C-on 100 µl inaktivált felülúszót és 200 µl SOLR™-baktériumot {genotípus: $e14^-$($McrA^-$) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R

[F' proAB lacI^{q}ZΔM15]^{c} Su^{-} (nem szuppresszáló) — lásd, Hay, B., Short, J.M., Strategies 5(1), 16-18 (1992) — OD = 1 600 nm-en}. Ötven mikroliter (100 mg/ml) ampicillin és 50 ml LB-tápközeg hozzáadása után az egész rendszert 37°C-on inkubáljuk egy éjszakán át kevertetés közben. A tenyészet 50 ml-éből plazmidot izolálunk *QIAGEN* Plasmid Midi Kit módszer szerint és *QIAGEN*-oszlopon (a *QIAGEN*-oszlopok anioncserélő gyantát tartalmaznak pozitívan töltött dietil-amino-etanol csoportokkal a felületükön, amelyek a DNS-váz foszfátjaival lépnek kölcsönhatásba). Így 1,37 μg/μl DNS oldatot kaptunk.

1.2. A CCK prekurzora egy részének amplifikációja az így elkészített plazmidbankból

1.2.1. A PCR-reakcióhoz szükséges két oligonukleotid szekvenciájának meghatározása

A két nukleotid egyike a CCK amidálási helyét kódoló szekvenciával komplementer szekvencia, az amidálási hely ismert és a szekvenciája glicin-arginin-arginin-szerin-alanin-glutaminsav. Ennek az *oligo CCK amide*-nak nevezett oligonukleotidnak a nuleotidszekvenciája:

5' CTCAGCACTGCGCCGGCC3'

A második, *oligo CCK 5'*-nek nevezett oligonukleotid a konszenzus szignálszekvenciának felel meg:

5' GTGTGTCTGTGCGTGGTG 3'

A várt amplifikációs termék mérete 315 bázispár, amely ezen két oligonukleotidnak megfelelő szekvenciák közötti távolság a CCK prekurzorszekvenciáján.

1.2.2. A PCR-reakció

Egy D1-hígítást készítünk, amely 1 µl Taq-polimeráz *Goldstar* 5 U/µl [lásd, Reynier, P., Pellissier, J.F., Harle, J.R., Malthiéry, Y., Biochemical and Biophysical Research Communications 205(1), 375-380 (1994)], 1 µl standard Taq-polimerázhoz való 10x koncentrált puffert és 8 µl vizet tartalmaz.

Egy µl 250 ng/µl *oligo CCK 5'*-t, 1 µl 250 ng/µl *oligo CCK amide*-ot, 1 µl dNTP-t (10 mmol mindegyik), 1 µl 250 ng/µl cDNS-bankot, 5 µl Taq-polimeráz enzimhez való 10x koncentrált puffert, 2 µl 25 mmol magnézium-kloridot, 1 µl D1-hígítást és 37 µl vizet összekeverünk.

Az amplifikációs körülmények a következők: először is hőkezelést végzünk 95°C-on 5 percen keresztül, majd azután 30 ciklust végzünk. A denaturációt 95°C-on 45 másodpercig, a hibridizációt 60°C-on 30 másodpercen keresztül és a láncHosszabbítást 72°C-on 1 percig végezzük. Végül egy kiegészítő ciklust is végrehajtunk 72°C-on 10 percen keresztül történő lánchosszabbítással.

1.2.3. Eredmények

Az eredményeket a PCR-reakció terméke 1/10 részének 0,8%-os agaróz gélben történő futtatásával értékeljük ki. 3,8-Diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium-bromid (etídium-bromid) jelenlétében egyetlen intenzív, a 300 molekulasúly-markernél egy kissé nagyobb méretű sáv látható.

1.3. A PCR-termék szubklónozása szekvenálást lehetővé tevő vektorba

A pGEM T-easy vektort alkalmazzuk (árusítja a PROMEGA Corporation, Madison, USA, hiv. szám A 1380 — a szekvenciát az I. függelékben adjuk meg). A lépések a következők:

— a PCR-terméknek megfelelő sávot elektroelúcióval tisztítjuk,

— egy éjszakán keresztül 16°C-on ligáljuk 1 µl 50 ng/µl pGEM T-easy vektorral és 1 µl 10x koncentrált ligáz pufferrel,

— a tisztított sávból kivont, körülbelül 20 ng/µl termék 3 µl-évei, amit

— vízzel 10 µl-re egészítünk ki.

Előzetesen kalcium-kloridos kezeléssel kompetenssé tett JM 109 baktériumokat {genotípus: e14$^-$(McrA$^-$) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K-m_{K+}) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^{q}ZΔM15] — lásd, Yanish-Perron, C., Viera, J., Messing, J., Gene 33, 103-199 (1985)} 45 másodperces 42°C-os hősokkal transzformáljuk a ligálás 1/5-évei. A sejteket ezután LB-ampicillin tápközegben tenyésztjük Petri-csészében egy éjszakán keresztül 37°C-on.

Néhány rekombináns klón plazmid DNS-ét izoláljuk. A szubklónozást *Eco*RI-enzimes emésztéssel igazoljuk.

1.4. Szekvenálás

A szekvenálást SANGER hagyományos, didezoxinukleotidokat alkalmazó módszerével végezzük a pGEM T-easy Vector jelű vektoron, amelybe a 315 bázispár nagyságú PCR-termék be lett építve (nagy mennyiségben állítottuk elő *QIAGEN* tip

100 reagenskészlet alkalmazásával). A szekvenáláshoz alkalmazott láncindító a pGEM T-easy Vector jelű vektorban lévő, univerzális T7-oligonukleotid.

1.5. Eredmények

A következő nyers szekvenciát kapjuk:

GTG TGT CTG TGC GTG GTG ATG GCA GTC CTG GCA GCA GGC GCC CTG GCG CAG CCG GTA GTC CCT GTA GAA GCT GTG GAC CCT ATG GAG CAG CGG GCG GAG GAG GCG CCC CGA AGG CAG CTG AGG GCT GTG CTC CGA CCG GAC AGC GAG CCC CGA GCG CGC CTG GGC GCA CTG CTA GCC CGA TAC ATC CAG CAG GTC CGC AAA GCT CCC TCT GGC CGC ATG TCC GTT CTT AAG AAC CTG CAG GGC CTG GAC CCT AGC CAC AGG ATA AGT GAC CGG GAC TAC ATG GGC TGG ATG GAT TTC GGC CGG CGC AGT GCT GAG

A kapott szekvencia aminosavakba történő átírása a következőt eredményezi:

VCLCVV MAVLAAGALA QPVVPVEAVD PMEQRAEEAP
RRQLRAVLRP DSEPRARLGA LLARYIQQVR KAPSGRMSVL
KNLQGLDPSH RISDRDYMGW MDFGRRSAE

amely révén a CCK (amelynek szekvenciája a Swiss Prot adatbankban, a p01355 nyilvántartási számon megtalálható) prekurzora nukleotidszekvenciája könnyen megtalálható.

Az aminosavakat a következő rövidítésekkel jelöltük:

alanin	A	leucin	L
arginin	R	lizin	K
aszparaginsav	D	metionin	M
aszparagin	N	fenilalanin	F
cisztein	C	prolin	P
glutaminsav	E	szerin	S
glutamin	Q	treonin	T

glicin	G	triptofán	W
hisztidin	H	tirozin	Y
izoleucin	I	valin	V

Függelék I

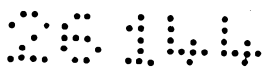
A pGEM® T-Easy Vector plazmid szekvenciája

A pGEM® T-Easy Vector plazmidot, amelynek szekvenciáját alább mutatjuk be, *Eco*RV-tel linearizáltuk ennek a szekvenciának a 60. bázisánál (csillag jelzi). Egy, két 3'-végű T-t adtunk hozzá. A hozzáadott T-t nem tüntettük fel a szekvenciában. Az alább bemutatott szekvencia T7-RNS-polimeráz által szintetizált RNS-nek felel meg, és komplementer az SP6-RNS-polimeráz által szintetizált RNS-sel.

```
  1  GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC CGGCCGCCAT GGCGGCCGCG
 51  GGAATTCGAT*ATCACTAGTG AATTCGCGGC CGCCTGCAGG TCGACCATAT
101  GGGAGAGCTC CCAACGCGTT GGATGCATAG CTTGAGTATT CTATAGTGTC
151  ACCTAAATAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT
201  TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG
251  TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC
301  GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA
351  TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC
401  CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCGTTCGG CTGCGGCGAG
451  CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAATCAGGG
501  GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA
551  CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG
601  ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
```



651 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC
701 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT
751 CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG
801 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA
851 GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG
901 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
951 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
1001 CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
1051 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
1101 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
1151 AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG
1201 CTCAGTGGAA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
1251 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC
1301 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA
1351 TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCGTTC ATCCATAGTT
1401 GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
1451 TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG
1501 ATTTATCAGC AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
1551 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC
1601 TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGGCATTG
1651 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAGC
1701 TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA
1751 AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG



```
1801  CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
1851  GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA
1901  GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT
1951  CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC
2001  ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT
2051  GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT
2101  CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT
2151  GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT
2201  CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA
2251  GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG
2301  CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGTA TGCGGTGTGA AATACCGCAC

2351  AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGAAATTGTA AACGTTAATA
2401  TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATATTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC
2451  CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA
2501  GATAGGGTTG AGTGTTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA
2551  ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC
2601  CCACTACGTG AACCATCACC CAAATCAAGT TTTTTGCGGT CGAGGTGCCG
2651  TAAAGCTCTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC
2701  GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA
2751  GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC
2801  CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCC ATTCGCCATT
2851  CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
2901  TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
2951  ACGCCAGGGT TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT
3001  GTAATACGAC TCACTATA
```

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egyszálú OX-oligonukleotid, amely 9-42 nukleotidból áll és enyhe körülmények között hibridizál egy Y1-Y2-Y3-Y4-Y5 szekvenciájú OY-oligonukleotiddal, amelyben Y1 jelentése 1-12 nukleotid vagy Y1 szuppresszálva van, Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 és Y4 jelentése egymástól függetlenül egy arginint vagy lizint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése 1-21 nukleotid vagy Y5 szuppresszálva van.

2. Az 1. igénypont szerinti OX-oligonukleotid, amely 9-42 nukleotidból áll és szigorú körülmények között hibridizál egy Y1-Y2-Y3-Y4-Y5 szekvenciájú OY-oligonukleotiddal, amelyben Y1 jelentése 1-12 nukleotid vagy Y1 szuppresszálva van, Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 és Y4 jelentése egymástól függetlenül egy arginint vagy lizint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése 1-21 nukleotid vagy Y5 szuppresszálva van.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti OX-oligonukleotid, ahol az OY-oligonukleotidban az Y1 szuppresszálva van.

4. Az 1., a 2. vagy 3. igénypontok bármelyike szerinti OX-oligonukleotid, ahol az OY-oligonukleotidban az Y5 szuppresszálva van.

5. Az 1., a 2. vagy 3. igénypontok bármelyike szerinti OX-oligonukleotid, ahol az OY-oligonukleotidban az Y5 jelentése egy Y6-Y7-Y8-Y9 szekvenciájú nukleotidszekvencia, amelyben Y6 jelentése egy szerint, treonint vagy tirozint kódoló nukleotidhármas, Y7 jelentése bármilyen aminosavat

kódoló nukleotidhármas, Y8 jelentése glutaminsavat vagy aszparaginsavat kódoló nukleotidhármas és Y9 jelentése 1-12 nukleotidot tartalmazó nukleotidszekvencia.

6. Az 5. igénypont szerinti OX-oligonukleotid, ahol az OY-oligonukleotidban Y1 és Y9 szuppresszálva vannak.

7. A 6. igénypont szerinti OX-oligonukleotid, amely hibridizál az OY-oligonukleotiddal, amelyben Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 jelentése egy lizint kódoló nukleotidhármas, Y4 jelentése egy arginint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése szerin-alanin-glutaminsavat kódoló három nukleotidhármas.

8. Egyszálú OY-oligonukleotid, amely Y1-Y2-Y3-Y4-Y5 szekvenciájú 9-42 nukleotidból áll, amelyben Y1 jelentése 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Y1 szuppresszálva van, Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 és Y4 jelentése egymástól függetlenül egy arginint vagy lizint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése 1-21 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Y5 szuppresszálva van.

9. A 8. igénypont szerinti OY-oligonukleotid, amelyben Y1 szuppresszálva van.

10. A 8. vagy 9. igénypontok szerinti OY-oligonukleotid, amelyben Y5 szuppresszálva van.

11. A 8. vagy 9. igénypontok szerinti OY-oligonukleotid, amelyben az Y5 jelentése egy Y6-Y7-Y8-Y9 szekvenciájú nukleotidszekvencia, amelyben Y6 jelentése egy szerint, treonint vagy tirozint kódoló nukleotidhármas, Y7 jelentése bármilyen aminosavat kódoló nukleotidhármas, Y8 jelentése glutaminsavat vagy aszparaginsavat kódoló

nukleotidhármas és Y9 jelentése 1-12 nukleotidot tartalmazó nukleotidszekvencia.

12. A 11. igénypont szerinti OY-oligonukleotid, amelyben Y1 és Y9 szuppresszálva vannak.

13. A 12. igénypont szerinti OY-oligonukleotid, amelyben Y2 jelentése egy glicint kódoló nukleotidhármas, Y3 jelentése egy lizint kódoló nukleotidhármas, Y4 jelentése egy arginint kódoló nukleotidhármas és Y5 jelentése szerin-alanin-glutaminsavat kódoló három nukleotidhármas.

14. Egyszálú OZ-oligonukleotid, amely 15-39 nukleotidból áll és enyhe vagy szigorú körülmények között amidált polipeptidhormonokra jellemző konszenzus szignálszekvenciával hibridizál, amely szekvencia Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 képletű, amelyben Z1 jelentése egy 1-12 nukleotidot tartalmazó nukleotidszekvencia vagy Z1 szuppresszálva van, Z2 és Z3 jelentése két, leucint kódoló nukleotidhármas, Z4 és Z5 jelentése két, bármilyen két aminosavat kódoló nukleotidhármas, Z6 jelentése egy leucint kódoló nukleotidhármas és Z7 jelentése egy 1-12 nukleotidos nukleotidszekvencia vagy Z7 szuppresszálva van.

15. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti OX-oligonukleotidok csoportja vagy a 14. igénypont szerinti OZ-oligonukleotidok csoportja, amely kombinatorikus könyvtárat alkot.

16. Eljárás egy amidált C-terminális végű peptid prekurzorának azonosítására, *azzal jellemezve,* hogy:

— egy DNS-bankot készítünk,

— az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti egy vagy több oligonukleotidot hibridizáltatjuk a DNS-bankkal,

— azonosítjuk a bank azon DNS-szekvenciáját vagy szekvenciáit, amelyek hibridizálnak az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotiddal,

— azonosítjuk ebben a szekvenciában vagy szekvenciákban a feltételezhetőleg amidált C-terminális végű peptid egy vagy több prekurzorát.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hibridizációs lépésben a 15. igénypont szerinti kombinatorikus könyvtárat alkalmazzuk.

18. Eljárás egy amidált C-terminális végű peptid prekurzorának azonosítására, *azzal jellemezve*, hogy a következő lépések szerint járunk el:

— egy DNS-bankot készítünk,

— PCR-módszer alkalmazásával amplifikáljuk az érdeklődésre számot tartó fragmenst az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotidok egy csoportjával és a 14. igénypont szerinti oligonukleotidok egy másik csoportjával,

— azonosítjuk a bank azon DNS-szekvenciáját vagy szekvenciáit, amelyekkel az 1.-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid hibridizál,

— azonosítjuk a szekvenciában vagy szekvenciákban a feltételezhetőleg amidált C-terminális végű peptidek egy vagy több prekurzorát.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy amplifikációs lépésben a 15. igénypont szerinti kombinatorikus könyvtárat alkalmazzuk.

20. Eljárás egy amidált C-terminális végű peptid prekurzorának azonosítására, *azzal jellemezve*, hogy a következő lépések szerint járunk el:

— egy DNS-bankot készítünk,

— PCR-módszer alkalmazásával amplifikáljuk az érdeklődésre számot tartó fragmenst az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotidok egy csoportjával,

— azonosítjuk a bank azon DNS-szekvenciáját vagy szekvenciáit, amelyekkel az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid hibridizál,

— azonosítjuk a szekvenciában vagy szekvenciákban a feltételezhetőleg amidált C-terminális végű peptidek egy vagy több prekurzorát.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az amplifikációs lépésben a 15. igénypont szerinti kombinatorikus könyvtárat alkalmazzuk.

22. Eljárás egy amidált C-terminális végű polipeptid prekurzorának azonosítására, *azzal jellemezve*, hogy a következő lépések szerint járunk el:

— egy DNS-bankot készítünk,

— PCR-módszer alkalmazásával amplifikáljuk az érdeklődésre számot tartó fragmenst az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid és egy másik egyszálú oligonukleotid segítségével, amely enyhe vagy szigorú körülmények között hibridizál egy abban a plazmidvektorban - amelyben a DNS-bank cDNS-e klónozva van - lévő univerzális konszenzusszekvenciával, például T3-, T7-, KS-, SK-, M13-, Reverse-láncindítókkal,

— azonosítjuk a bank azon DNS-szekvenciáját, amellyel az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti oligonukleotid hibridizál,

— azonosítjuk a szekvenciában a feltételezhetőleg amidált C-terminális végű peptidek egy vagy több prekurzorát.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az amplifikációs lépésben a 15. igénypont szerinti kombinatorikus könyvtárat alkalmazzuk.

24. A 16.-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy DNS-bankként cDNS-bankot alkalmazunk.

25. A 16-24. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egyszálú oligonukleotidot egy jelölő anyag, például ^{32}P vagy digoxigenin segítségével mutatjuk ki.

A meghatalmazott:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Svingor Ádám

29 oldal
Bevett