



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**219 369 B**

- (21) A bejelentés ügyszáma: P 92 02737  
(22) A bejelentés napja: 1992. 08. 25.  
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/750,080 1991. 08. 26. US  
07/914,738 1992. 07. 20. US

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 12 N 15/34**

C 12 N 15/09

C 12 N 15/86

C 12 N 5/10

- (40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2001. 03. 28.

(72) Feltalálók:

dr. Dorner, Friedrich, Bécs (AT)  
dr. Falkner, Falko-Günter, Mannsdorf (AT)  
Pfleiderer, Michael, Breitstetten (AT)  
Scheiflinger, Friedrich, Orth/Donau (AT)

(73) Szabadalmaz:

Baxter AG, Bécs (AT)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54)

**Eljárás módosított chordopoxvírus előállítására  
közvetlen molekuláris klónozással, módosított chordopoxvírus,  
valamint eljárás alkalmazására**

### **KIVONAT**

A találmány tárgya eljárás módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus előállítására módosított virális genom közvetlen molekuláris klónozásával, amelynek során extracelluláris körülmények között módosított vírusgenomot tartalmazó DNS-molekulát állítanak elő, azt a vírusgenomot fertőző virionokba pakoló gazdasejt-

be juttatják be, és abból kinyerik a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionokat. A találmány tárgya továbbá a közvetlen molekuláris klónozása útján előállított módosított chordopoxvírus, annak genomját tartalmazó DNS-molekula, valamint eljárás rekombináns fehérje előállítására módosított vírus alkalmazásával.

**HU 219 369 B**

A találmány tárgya eljárás módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus előállítására módosított virális genom közvetlen molekuláris klónozásával, amelynek során extracelluláris körülmények között módosított vírusgenomot tartalmazó DNS-molekulát állítunk elő, azt a vírusgenomot fertőző virionokba pakoló gazdasejtbe juttatjuk be, és abból kinyerjük a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionokat. A találmány tárgya továbbá a közvetlen molekuláris klónozása útján előállított módosított chordopoxvírus, annak genomját tartalmazó DNS-molekula, valamint eljárás rekombináns fehérje előállítására módosított vírus alkalmazásával.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható poxvírusok klónozása és rekombináns fehérjék előállítása területén.

A találmány egyik előnyös megvalósítási formája szerint a kívánt gént tartalmazó idegen DNS-fragmentet közvetlenül inzertáljuk egy genomális poxvírus-DNS-be egy olyan restriktációs endonukleáz hasítási helyen, amely a virális genomban egyetlen, és a módosított virális DNS-t virionokba pakoljuk helperpoxvírussal fertőzött sejtekbe való transzfektálással.

Az eukarióták citoplazmatikus DNS-vírusai közé tartoznak a különféle poxvírusok és az iridovírusok, amelyek meleg vérűekben és rovarokban találhatók. Rekombináns genomokat tartalmazó poxvírusokat már alkalmaztak különféle inzertált gének expressziójára. Ilyen poxvírusok alkalmazhatók például biológiailag aktív polipeptidok előállítására sejtenyészetekben, például arra a célra, hogy vakcinaantigéneket közvetlenül egy állat vagy egy ember immunrendszerébe juttassanak. Idegen gének expressziójára alkalmas rekombináns iridovírus-genomok szerkesztését még nem ismertették a géntechnológia szakirodalmában.

Idegen géneket tartalmazó rekombináns poxvírus-genomok szerkesztésére a hagyományos módszerek részben *in vivo* (intracelluláris) rekombináción alapulnak. Az intracelluláris rekombináció alkalmazását először Sam és Dumbell [Ann. Virol. (Institut Pasteur) 132E, 135 (1981)] írták le mint a „marker rescue” folyamatát virális DNS szubgenomiális fragmenteivel. Fenti szerzők bizonyították, hogy egy hőmérséklet-érzékeny vacciniavírus mutáns valamely nyúl poxvírus szubgenomiális DNS-fragmentével való intracelluláris rekombinációval megmenthető. Az intracelluláris rekombinációra általában alkalmazott módszereket még ma is használják.

A nem poxvírus (idegen) géneket tartalmazó rekombináns vacciniavírusok szerkesztését később Panicali és Paoletti írták le [Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A. 79, 4927–4931 (1982); Mackett és munkatársai: Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A. 79, 7415–7419 (1982); és 4 769 330 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. Közelebbről a rekombináns poxvírusok előállítására használatos technológia két lépésből áll. Első lépésben egy olyan DNS-fragmentet készítenek, amely egy idegen gént körülvevő poxvírusgenommal homológ régiókat tartalmaz. Úgy is eljárhatnak, hogy egy inszerciós plazmidot szerkesztenek egy idegen génnek egy plazmiddal való *in vitro* intracelluláris rekombinálásával. Ez a plazmid egy rövid virális DNS-szek-

venciát tartalmaz, amely homológ a poxvírusgenom azon régiójával, ahol a gén inszerciója végső soron kívánatos. Az idegen gént a plazmidba inzertálják a virális DNS-szekvenciákkal határolt helyen, és rendszerint egy poxvírus promotor után (5'→3' irányban), amely az inzertált gén transzkripcióját szabályozni fogja. Második lépésben az inszerciós plazmidot a célpoxvírussal fertőzött gazdasejtekbe vezetik be. A gént ezután indirekt módon inzertálják a poxvírusgenomba, a poxvírusgenomban lévő homológ virális szekvenciák és a plazmid idegen gént tartalmazó része közötti rekombinálással. A kapott rekombináns genom ezután replikálódik, és ily módon fertőzőképes poxvírus keletkezik.

Így minden egyes gén poxvírusgenomba való inszerciójához mindeddig egy külön plazmidra volt szükség, mely a virális szekvenciákkal határolt gént tartalmazta, amely szekvenciákat a kívánt inszerciós helyzet szempontjából választották meg. Ennek a megoldásnak az egyik hátránya az, hogy minden egyes rekombináns poxvírus előállításához egy új inszerciós plazmid szükséges. Minden egyes plazmidot extracelluláris rekombináns DNS-módszerekkel kell megszerkeszteni, sokszorozítani baktériumsejtekben, majd igen munkaigényesen izolálni és alaposan tisztítani kell, mielőtt a poxvírussal fertőzött gazdasejtekhez adnánk.

Az ismert módszer másik hátránya az, hogy a rekombináns genomokat igen alacsony hozammal nyerik, ami az egyes vírusok százainak szűrővizsgálatát teszi szükségessé azért, hogy egyetlen kívánt rekombinánsot találjanak. Az alacsony hozam az egyes intracelluláris rekombinációs események kis gyakoriságának tulajdonítható azzal párosítva, hogy az inszerciós plazmid virális genomba való beépülésének elérésére több ilyen eseményre van szükség. Ennek eredményeként az intracelluláris rekombinációs módszerekkel előállított virális genomok többsége szülői genom, amelyben nincs jelen idegen gén. Ezért gyakran egy olyan szelektív markergént kell bevezetni a poxvírusgenomba a másik kívánt szekvenciával együtt, amely lehetővé teszi a kívánt ritka rekombinánsok detektálását anélkül, hogy szükség lenne a számos egyedi vírusklónból izolált DNS-ek jellemzésére.

Eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusokból származó tisztított DNS-ek képtelenek replikálódni, ha érzékeny gazdasejtekbe vezetik be azokat olyan módszerekkel, amelyek a sejtmagban replikálódó virális DNS-ekkel iniciálják a fertőzést. A citoplazmatikus DNS-vírusokból származó DNS-ek fertőzőképességének hiánya abból a tényből ered, hogy a virális transzkripciót a fertőzött sejtekben iniciálni kell egy vírusspecifikus RNS-polimerázzal, amely a fertőző virionokban normálisan jelen van.

A poxvírus-DNS reaktiválása – amelynek során egy inaktivált, nem fertőző poxvírusrészcsekkében lévő genomális DNS-t fertőzőképes virionokba csomagolnak egy életképes helperpoxvírussal való együttfertőzés útján – már évtizedek óta ismert, lásd például Fenner és Woodrooffe munkáját [Virology 11: 185–201 (1960)]. 1981-ben Sam és Dumbell bizonyították, hogy egy első

poxvírusból izolált, nem fertőző genomiális DNS becsomagolható fertőző poxvírusvirionokba egy másik, genetikailag eltérő poxvírussal fertőzött sejtekben. [Sam és Dumbell, *Ann. Virol. (Institut Pasteur)* 132E; 135 (1981).] A csupasz poxvírus-DNS fenti bepakolását először egy virionokból vagy fertőzött sejtekből izolált, vad típusú ortopoxvírusgenomot tartalmazó módosított DNS egy második, természetben előforduló ortopoxvírusgenommal fertőzött sejtekben való transzfekciójával bizonyították. Azonban a heterológ pakolást – azaz az egyik fajta poxvírusból (például ortopoxvírusból) származó DNS bepakolását egy másik fajta, például szárnyas poxvírus életképes virionjaival – eddig még nem ismertették.

Az intracelluláris rekombináció alkalmazását nem poxvírusgéneket expresszáló rekombináns poxvírusgenomok előállítására röviddel Sam és Dumbell után írták le, akik először ismertették a csupasz poxvírus-DNS bepakolását poxvírusvirionokba és a DNS-fragmensekkel való marker rescue-t intracelluláris rekombináció segítségével. [Panicali és Paoletti (1982); Mackett és munkatársai (1982).] A következő évtizedben a vonatkozó irodalomban azonban nem található közvetlen molekuláris klónozásra vonatkozó leírás, azaz valamely eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus – főleg poxvírus – módosított genomjának megszerkesztése pusztán extracelluláris géntechnológiai módszerekkel. A szakirodalomban még csak arra sincsen bizonyíték, hogy felismerték volna az ilyen közvetlen klónozási módszerből származó előnyöket. Éppen ellenkezőleg azt a nézetet hangoztatták, hogy a közvetlen molekuláris klónozás nem praktikus a poxvírusok genetikai módosítása vonatkozásában, mivel a poxvírus-DNS nem fertőző [F. Fenner, R. Wittek és K. R. Dumbell: *The Poxviruses* (Academic Press, 1989)]. Ugyanígy az ezen a szakterületen dolgozó többi kutató sem foglalkozott a poxvírus-DNS endonukleáz hasításával és újraligálásával, még akkor sem, amikor felismerték a rekombináns poxvírusgenomot tartalmazó izolált DNS fertőző vírus általi „megmentésének” lehetőségét [lásd például Mackett és Smith, *J. Gen. Virol.* 67, 2067–2082 (1986)]. Ezen túlmenően a legújabb irodalmi áttekintések is azt az elméletet támasztják alá, hogy a rekombináns poxvírusgenomok előállításának egyetlen járható útja az intracelluláris rekombinációs módszerek alkalmazásával jár [Miner & Hruby, *TIBTECH* 8, 20–25 (1990), és Moss Flexner, *Ann. Rev. Immunol.* 5, 305–324 (1987)].

A fentiek ismeretében célul tűztük ki olyan módszer kidolgozását eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusok, főleg poxvírusok módosított genomjainak megszerkesztésére, amely kiküszöböli az intracelluláris rekombináción alapuló hagyományos módszerekkel kapcsolatos fenti hátrányokat.

Másik célkitűzésünk a citoplazmatikus DNS-vírus genomok előállítására olyan módszerek kidolgozása volt, amelyek segítségével lényegesen nagyobb hozammal állíthatók elő a rekombinánsok, mint a meglévő módszerekkel.

További célkitűzésünk volt a citoplazmatikus DNS-vírusok genomjának módosítására olyan módszerek ki-

dolgozása, amelyek alkalmasak a genomiális vírus-DNS közvetlen módosítására, és a módosított virális DNS virionokba való intracelluláris pakolására helper-vírusok segítségével.

5 További célkitűzésünk volt olyan módszerek kidolgozása a citoplazmatikus DNS-vírusok genomjának szerkesztésére, amelyek egyetlen rekombinációs reakció lépésben alkalmasak olyan módosított genomok előállítására, amelyek a két lehetséges orientáció közül mindkettőben tartalmazzák az inzertált idegen DNS-szegmenst, és amely módosított genomokba több idegen DNS-szegmens van inzertálva.

10 A találmány újabb célja volt olyan módosított DNS-molekulák előállítása, amelyek alkalmasak idegen gének közvetlen molekuláris klónozására módosított citoplazmatikus DNS-vírus-genomban, amelyek egy genomiális vírus-DNS két részét foglalják magukban, amelyeket a virális genom egyetlen ilyen hasítási helyén szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítással állítottunk elő. A találmány további célkitűzése volt olyan módosított genomot tartalmazó citoplazmatikus DNS-vírus, főleg poxvírus előállítása, amely módosított genom egy szekvenciaspecifikus endonukleáz egyetlen ilyen hasítási helyébe inzertálva egy idegen DNS-t tartalmaz.

25 További célkitűzésünk volt olyan plazmidok előállítása, amelyek lehetővé teszik génkazetták szerkesztését és átvitelét citoplazmatikus DNS-vírusba, főleg poxvírusba közvetlen molekuláris klónozás alkalmazásával.

30 A fenti és egyéb célok megvalósítása során a találmány egyik tárgya értelmében kidolgoztunk egy eljárást módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus előállítására, egy módosított citoplazmatikus DNS-vírus genomot tartalmazó módosított DNS-molekula közvetlen molekuláris klónozásával. A találmány szerinti eljárás az alábbi lépéseket foglalja magában:

35 (i) valamely első citoplazmatikus DNS-vírus-genomot tartalmazó tisztított DNS-molekulát extracelluláris körülmények között módosítva előállítunk egy módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekulát; (ii) a módosított DNS-molekulát bevisszük valamely első gazdasejtbe, amely a módosított DNS-molekulát fertőző virionokba pakolja; és (iii) a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionokat az első gazdasejtből kinyerjük.

45 A fenti eljárás egyik kiviteli alakja szerint a DNS-molekula módosításának lépése extracelluláris körülmények között a DNS-molekula szekvenciaspecifikus endonukleázzal való hasítását jelenti. Egy másik kiviteli alak szerint a DNS-molekula módosításának lépése valamely első DNS-szekvencia inzertálását jelenti valamely első virális genomba. Ezt az első DNS-szekvenciát előnyösen a szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyén illesztjük az első genomba. Megjegyezzük, hogy amennyiben egy bizonyos szekvenciaspecifikus endonukleáz, például egy bakteriális restrikciós enzimet említünk név szerint, ez a név a megadott nukleáz bármely izoskizomerjét is jelenti.

60 A DNS-molekula módosításának lépése a találmány szerinti eljárás értelmében egy foszfatáz alkalma-

zását is jelentheti, hogy a DNS-molekula szekvencia-specifikus endonukleázzal való hasításával előállított DNS-szegmens végéről egy foszfátmaradékot eltávolítunk.

A találmány szerinti eljárás egy bizonyos kivitelezési módja szerint az első virális genom egy vacciniavírus-genom, és az egyetlen hasítási hely az NotI vagy SmaI bakteriális restrikciós endonukleáz hasítási helye. Az első genom egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomban természetes körülmények között nem előforduló második DNS-szekvenciát is tartalmazhat, mimellett ez a második DNS-szekvencia tartalmazza az egyetlen hasítási helyet. Így például az első genom egy szárnyaspoxvirus-genom lehet, amely egy *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz génszekvenciát foglal magában, és az egyetlen hasítási hely az ebben a génben elhelyezkedő NotI bakteriális restrikciós endonukleáz hasítási helye.

A fenti eljárás egy másik megvalósítási módja szerint az első DNS-szekvencia valamely első szekvencia-specifikus endonukleáz első hasítási helye és valamely második szekvenciaspecifikus endonukleáz második hasítási helye közé van inzertálva az első virális genomban. Adott esetben az első és a második hasítási hely közül mind a kettő az egyetlen ilyen hely az első virális genomban.

A találmány szerinti eljárás egy további megvalósítási módja szerint az első genomba inzertált első DNS-szekvenciának legalább egy része valamely promoter transzkripció szabályozása alatt van. Ez a promoter az első virális genomba inzertált első DNS-szekvenciában helyezkedhet el. A promoter azonban elhelyezkedhet az első genomba inzertált első DNS-szekvencia előtt (3'→5'-irányban) is a módosított virális genomban. Bizonyos esetekben a promotert egy módosított virális genom által kódolt RNS-polimeráz hasznosítja. Ez a promoter alkalmas lehet a módosítandó eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus RNS-polimeráza általi transzkripció iniciálására is. Bizonyos módszerekben a promoter az eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus természetben előforduló promoterének egy módosított formája lehet.

A találmány szerinti eljárásban a DNS-molekula módosításának lépése egy DNS-szekvencia törlése is lehet az első genomból. Ez a lépés lehet az első genom egy DNS-szekvenciájának helyettesítése is.

Az első virális genom módosításának módszere magában foglalhatja az első gazdasejt valamely második eukarióta citoplazmatikus DNS-vírussal való infektálásának lépését is, amely egy második genomot tartalmaz, amely a módosított virális genom fertőző virionokba való bepakolását expresszálja. A módosított DNS-molekula gazdasejtbe való bevitelének lépését előnyösen az első gazdasejt valamely második eukarióta citoplazmatikus DNS-vírussal való infektálása után 1 órával hajtjuk végre.

A fenti eljárás egyik változata szerint az első gazdasejtet úgy választjuk meg, hogy a második genom expressziója az első gazdasejtben nem eredményez második virális genomot tartalmazó fertőző virionokat. Pé-

dául abban az esetben, ha a módosított virális genom egy módosított vacciniavírus-genom, és a második genom egy szárnyaspoxvirus-genom, a választott első gazdasejt egy emlőssejt.

A virális genom módosítására szolgáló eljárás egy bizonyos formájában a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionok visszanyerésének lépése abból áll, hogy az első gazdasejt által termelt fertőző virionokkal infektálunk egy második gazdasejtet. Ezt olyan körülmények között végezzük, hogy a második genom expressziója a második gazdasejtben nem eredményez második genomot tartalmazó fertőző virionokat. Így például ha a módosított virális genom egy módosított vacciniavírus-genom, a második genom egy szárnyaspoxvirus-genom lehet, és a második gazdasejt egy emlőssejt. A módosított virális genom tartalmazhat egy funkcionális gazdaspecifikus gént is, amely a második gazdasejtben a fertőző virionok termeléséhez szükséges, és a második genomból hiányzik ez a funkcionális gazdaspecifikus gén. Ezt az esetet azzal szemlélítjük, amikor a módosított virális genom egy módosított vacciniavírus-genom, amely humán sejtekben fertőző virionok termeléséhez szükséges funkcionális gazdaspecifikus gént tartalmaz, és a második gazdasejt egy humán sejt.

A fenti eljárás egy másik megvalósítási módja szerint a módosított virális genom egy szelektív marker-gént tartalmaz, a második genomból hiányzik ez a szelektív marker-gén, és a második gazdasejt infektálásának lépését olyan körülmények között hajtjuk végre, hogy ezt a szelektív marker-gént expresszáló genomra szelektálunk. A szelektív marker-gén expressziója a második gazdasejtben előnyösen a második gazdasejtnél rezisztenciát biztosít egy citotoxikus hatóanyaggal szemben, amely az infekció során olyan mennyiségben van jelen, amennyi elegendő a szelektív marker-gént expresszáló genomra való szelektáláshoz.

A találmány tárgya továbbá egy módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus, amelyet módosított virális genom közvetlen molekuláris klónozásával állítottunk elő a fent összefoglalt módszerek szerint. A találmány tárgyát képezi továbbá egy módosított virális genomot tartalmazó módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus is, amely módosított virális genom tartalmazza: (i) egy első eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus első genomját; ez az első genom egy szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz, és ez a hasítási hely az egyetlen ilyen hely ebben az első genomban. A módosított genom ezenkívül tartalmaz (ii) egy, az első genom egyetlen hasítási helyére inzertált első DNS-szekvenciát.

A találmány fenti tárgyának fő megvalósítási módja szerint az első DNS-szekvencia egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes körülmények között nem fordul elő. Bizonyos előnyös esetekben az első genom egy vacciniavírus-genom, és az egyetlen hasítási hely az NotI vagy SmaI bakteriális restrikciós endonukleázok valamelyikének hasítási helye.

Az első genom tartalmazhat egy második DNS-szekvenciát is, amely eukarióta citoplazmatikus DNS-

vírusok genomjában természetes körülmények között nem fordul elő, és ez a második DNS-szekvencia tartalmazza az egyedi hasítási helyet. Például az első genom egy szárnyaspoxvírus-genom, amely az *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz-gént tartalmazza második DNS-szekvenciaként, és az egyedi hasítási hely ebben a génben az *NotI* bakteriális restrikciós endonukleáz hasítási helye.

Bizonyos találmány szerinti módosított vírusokban a fenti, az egyedi hasítási helyre inzertált első DNS-szekvenciának legalább egy része egy promoter transzkripció szabályozása alatt áll. Ez a promoter az első genomba inzertált első DNS-szekvenciában helyezkedik el. Bizonyos esetekben az első genom egy poxvírusgenom, és a promoter egy poxvírus promoter, amely vagy egy természetben előforduló poxvírus promoter vagy annak egy módosított formája lehet.

A találmány további tárgya egy módosított virális genomot tartalmazó módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus, amelyben a módosított virális genom tartalmazza (i) egy első eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus első genomját. Ez az első genom valamely első szekvenciaspecifikus endonukleáz számára egy első hasítási helyet, és valamely második szekvenciaspecifikus endonukleáz számára egy második hasítási helyet tartalmaz. A fenti hasítási helyek közül mindkettő egyetlen ilyen hely az első genomban.

Ebben a módosított vírusban a módosított genom továbbá tartalmaz (ii) egy első DNS-szekvenciát az első genomba inzertálva az első egyetlen hasítási hely és a második egyetlen hasítási hely között. A fenti módosított vírus bizonyos formáiban az első DNS-szekvencia az eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusok genomjában természetes körülmények között nem fordul elő. Bizonyos esetekben az első genom tartalmaz egy második DNS-szekvenciát is, amely eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusok genomjában természetes körülmények között nem fordul elő, és ez a második DNS-szekvencia az első egyetlen hasítási hely és a második egyetlen hasítási hely közé inzertált első DNS-szekvenciában található. Ez a módosított vírus például tartalmazhat egy első genomot, amely egy vacciniavírus-genom, és az első egyetlen hasítási hely és a második egyetlen hasítási hely az *NotI*, *SmaI*, *ApaI* vagy *RsrII* bakteriális restrikciós endonukleáz hasítási helye.

Egy találmány szerinti másik eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus egy olyan módosított virális genomot tartalmaz, amely (i) valamely első eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus első genomját tartalmazza. Ez az első genom egy első DNS-szekvenciát tartalmaz, és ez az első DNS-szekvencia tartalmaz egy szekvenciaspecifikus endonukleáz számára egy hasítási helyet, amely ebben a módosított virális genomban az egyetlen ilyen hely. Ennek a módosított vírusnak ez a genomja tartalmaz továbbá (ii) egy promotert, amely úgy helyezkedik el, hogy a virális genomban az egyetlen hasítási helyre inzertált DNS-szekvencia a promoter transzkripció szabályozása alatt áll. Bizonyos kiviteli alakokban ez az első DNS-szekvencia nem tartalmaz translációs startkodont a promoter és az egyetlen inszerciós hely kö-

zött. Ez az első DNS-szekvencia olyan szekvencia is lehet, amely eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes körülmények között nem fordul elő. Ez a módosított vírus például egy olyan vírus lehet, amelynek az első genomja egy vacciniavírus-genom és az első DNS-szekvencia egy többszörös klónozóhelyet tartalmaz, amely az *NotI*, *SamI*, *ApaI* és *RsrII* bakteriális restrikciós endonukleázok számára tartalmaz hasítási helyeket.

A találmány továbbá olyan módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusra is vonatkozik, amelyben a módosított virális genomban lévő első szekvencia (egy inzertált érdekes szekvencia) egy gazdasejtben expresszáldva egy protein termelését eredményezi.

A találmány vonatkozik továbbá olyan DNS-molekulára is, amely egy találmány szerinti módosított vírus módosított virális genomját tartalmazza. Közelebről a fenti DNS-molekula bizonyos formái tartalmazzák egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus módosított virális genomjának egyik végét, amelyben (i) a módosított virális genomnak ez a vége egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes körülmények között nem előforduló DNS-szekvenciát tartalmaz. Ebben a DNS-molekulában (ii) a módosított virális genom egy szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz, amely az egyetlen ilyen hely ebben a módosított virális genomban; és (iii) a DNS-molekula olyan terminálissal rendelkezik, amely homológ a módosított virális genomban lévő egyetlen hasítási hely szekvenciaspecifikus endonukleázzal való hasításával kapott véggel.

A fenti DNS-molekula bizonyos alakjaiban az eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes körülmények között nem előforduló DNS-szekvenciában van a hasítási hely a szekvenciaspecifikus endonukleáz számára, és ez az egyetlen ilyen hely ebben a módosított virális genomban.

A találmány továbbá egy készletre is vonatkozik eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus módosított virális genomjának közvetlen molekuláris klónozására, amely készlet tartalmaz

(i) egy tisztított, találmány szerinti DNS-molekulát; (ii) egy DNS-ligázt; és (iii) pufferoldatokat és reagenseket, amelyek alkalmasak DNS-szegmensek ligálására és ezáltal a módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekulák előállítására.

Az egyik kiviteli alak szerint ez a készlet tartalmaz továbbá egy plazmidot is, amely egy szekvenciaspecifikus endonukleáz számára megfelelő hasítási helyekkel határolt génkasszétát tartalmaz, amely helyek alkalmasak arra, hogy a kazettát a készletben lévő DNS-molekula által kódolt módosított virális genom egyetlen hasítási helyére inzertáljuk. A készlet tartalmazhat ezenkívül egy első gazdasejtet és egy második vírust, amely alkalmas a módosított virális genom fertőző virionokba való pakolására.

A találmány vonatkozik továbbá olyan plazmidokra is, amelyek olyan DNS-szegmenst tartalmaznak, amely mindkét végén tartalmaz egy *NotI* bakteriális restrikciós

endonukleáz hasítási helyet. Ebben a plazmidban ez a DNS-szegmens tartalmaz egy olyan szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet is, amely a plazmidban az egyetlen ilyen hely. Erre a plazmidra példát az 1.3 ábrán mutatunk be, ezt a plazmidot pN2-nek nevezzük, és az 1. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza. Ebben a plazmidban a DNS-szegmens tartalmazhat továbbá egy szelektív markergént is a poxvirus promotor transzkripció szabályozása alatt. Így például az ilyen plazmidok közé tartozik a pN2-gpta plazmid is, amely a 2. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, és a pN2-gptb plazmid, amely a 3. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Egy találmány szerinti másik plazmid olyan DNS-szegmenst tartalmaz, amely egy restrikciós endonukleáz hasítási helyet tartalmazó DNS-szekvenciához működőképesen kötött poxvirus promotert tartalmaz. Ily módon erre a hasítási helyre inzertált DNS-szegmens ennek a promoternak a transzkripció szabályozása alatt áll. Példaként említhetjük ezekre a plazmidokra a pA1-S2 plazmidot, amely a 11. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, és a pA2-S2 plazmidot, amely a 12. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza. Egy olyan plazmidra, amely egy másik poxvirus promotor kontrollja alatt álló szelektív markergént is tartalmaz, példaként a pN2gpt-S4 plazmidot említjük, amely a 14. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Egy találmány szerinti másik plazmid egy poxvirusgenom-szegmenst tartalmaz, amely ennek a poxvirusnak egy timidin-kináz génjét tartalmazza. A timidin-kináz gént úgy módosítottuk, hogy az aktív timidin-kináz expresszióját megakadályozzuk, mint például a pHindJ-2 plazmidban, amely a 4. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, és a pHindJ-3 plazmidban, amely az 5. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Egy másik találmány szerinti plazmid egy poxvirus promotert tartalmaz egy translációs startkodonhoz működőképesen kötve. Ezt a startkodont közvetlenül egy második restrikciós endonukleáz hasítási hely követi olyan elrendezésben, amely lehetővé teszi egy, ebbe a második restrikciós endonukleáz hasítási helybe inzertált nyitott leolvasási keret translációját. Erre a plazmidra példaként említhetjük a pA1-S1 plazmidot, amely a 9. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza és a pA2-S1 plazmidot, amely a 10. azonosítási szekvenciát tartalmazza, valamint a pN2gpt-S3A plazmidot, amely a 13. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Ez utóbbi típusú plazmidok egyik képviselője tartalmaz továbbá egy humán protrombint kódoló DNS-szekvenciát is, amely DNS-szekvencia a poxvirus promoterhez és egy startkodonhoz van működőképesen kötve, amint azt az 5.1 ábra mutatja a pA1S1-olvasáspont plazmidban, amely a 15. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Egy találmány szerinti másik plazmid egy humán plazminogént kódoló és egy translációs startkodont tartalmazó DNS-szekvenciát is tartalmaz, ahol ez a DNS-szekvencia a poxvirus promoterhez van működőképesen kötve. Az 5.2 ábra szerint ezt a plazmidot a pN2gpt-S4-ből származó plazmidokkal szemléltetjük,

ilyen például a pN2gpt-GPg plazmid, amely a humán glu-plazminogént kódolja, és a 17. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, valamint a pN2gpt-LPg plazmid, amely a lys-plazminogént kódolja és a 18. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Egy találmány szerinti másik plazmid tartalmaz továbbá humán immunhiányvírus (HIV) gp160-at kódoló és egy translációs startkodont tartalmazó DNS-szekvenciát is, amely a poxvirus promoterhez működőképesen van kötve, mint például az 5.4 ábrán látható, 19. azonosítási számú szekvenciát tartalmazó pN2gpt-gp160 plazmid. Végül egy újabb plazmid humán von Willebrand-faktort kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz, mint például a 6.2 ábrán látható, 20. azonosítási számú szekvenciát tartalmazó pvWF plazmid.

A találmány szerinti bizonyos plazmidok olyan szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaznak, amely egyetlen a poxvirusgenomjában. Ezekre szolgál példaként a 4.3 ábrán látható pAO plazmid, amely a 6. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, a pA1 plazmid, amely a 7. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, és a pA2 plazmid, amely a 8. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

Egy másik plazmid a vacciniavírus-DNS módosított EcoRI K-fragmensét tartalmazza, amelyből a K1L gazdaspecifikus gén törölve van, amint azt a 8.1 ábra mutatja. Erre két példát említünk, a pEcoK-dhr-t, amely a 21. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza, és a pdhr-gpt-t, amely a 22. azonosítási számú szekvenciát tartalmazza.

A találmány egyéb célkitűzései, jellemzői és előnyei az alábbi részletes leírásból kitűnnek. Megjegyezzük azonban, hogy a specifikus példák és a részletes leírás a találmány előnyös megvalósítási módjaira vonatkoznak, amelyeket a szemléletesség kedvéért közlünk pusztán, a korlátozás szándéka nélkül, és a különféle, szakember számára kézenfekvő változtatások és módosítások szintén a találmány tárgykörébe tartoznak. Az ábrákat röviden az alábbiakban ismertetjük.

Az 1.1 ábra szemlélteti a markergének expresszióját csupasz poxvirus-DNS reaktiválásával nyert módosított poxvirusgenomok által. Az ábrán látható a bepakolt vírusokkal (vpPg#1-vpPg#8) és kontrollként a vad típusú (WT) vírussal fertőzött sejtek tenyészetének felülszójában termelődött proteinek ezüsttel festett poliakrilamid-gélelektroforézis képe. A felső nyíl a plazminogén markersávra mutat, az alsó nyíl a fő szekretált 35 K vaccinia marker proteinsávját mutatja. 1. és 9. sáv: a marker proteinek; a 2. és 10. sáv: a humán plazminogén standard (10 ng); 3. sáv: a vaccinia rekombináns vPgD (bepakolt DNS-forrása); 4-7. és 11-14. sávok: vpPg#1-8; a 8. és 15. sáv: a vad típusú vaccinia (WR WT).

A 1.2 ábra mutatja sematikusan poxvirusgenomok közvetlen molekuláris klónozását, amelyek egy génkassetát tartalmaznak egy markergén (E. coli gpt gén) expressziójára egy vacciniavírus promotor szabályozása alatt.

Az 1.3 ábra mutatja sematikusan a pN2-gpta és pN2-gptb plazmidok szerkesztését, amelyekből mint

prekurzorokból a génexpressziós kazetták állíthatók elő egy promotor és egy nyitott leolvasási keret inzertálásával. Ezek a kazetták egy egyedi inszerciós hely és egy vacciniavírus promotor szabályozása alatt álló szelektálható markergén (gpt) alkalmazásával vaccinia-vírus-vektorokba való közvetlen molekuláris transzferre vannak tervezve. MCS=többszörös klónozási hely; P7,5=a vaccinia 7,5K polipeptidgén promotere; P11=a vaccinia 11K polipeptidgén promotere. A nyilak jelzik a promoterekből való transzkripció irányait.

Az 1.4 ábrán bizonyítjuk, hogy a közvetlen molekuláris klónozással előállított poxvirusgenomok a gpt markergénkazettát az egyetlen NotI hasítási helyre inzertálva tartalmazzák, amint azt HindIII endonukleázzal emésztett, plakk tisztított virális DNS-ek Southern-blot-analízise mutatja gpt-gén próba alkalmazásával. 1. sáv: marker DNS-ek (HindIII-mal emésztett  $\lambda$ -fág-DNS); 2. és 3. sáv: HindIII-mal hasított vad típusú vacciniavírus (WR)-DNS (500 és 100 ng); 4–9. sáv: a 2.1.1–7.1.1 jelzésű plakkokkal fertőzött sejtek DNS-ei; 10–12. sáv: 10.1.1–12.1.1 jelzésű plakkokkal fertőzött sejtek DNS-ei. Nyilak jelzik a marker restrikciós fragmenseinek méretét kilobázispárban.

Az 1.5 ábra illusztrálja továbbá a módosított poxvirus-DNS-ek szerkezetét a különféle izolátumokkal fertőzött sejtek NotI-gyel hasított DNS-einek Southern-blot-analízisével, gpt-gén-próbával hibridizálva. 1 sáv: marker-DNS-ek (HindIII-mal emésztett  $\lambda$ -fág-DNS); 2. sáv: NotI-gyel hasított vad típusú (WT) vaccinia-DNS (50 ng); 3–8. sáv: 2.1.1–7.1.1 jelzésű rekombináns plakkokkal fertőzött sejtek DNS-ei; 9–11. sáv: 10.1.1–12.1.1 jelzésű plakkokkal fertőzött sejtek DNS-ei.

Az 1.6 ábra mutatja vad típusú (WT) vacciniából és a módosított klónból (vp7) származó DNS-ek összehasonlítását, a megadott restrikciós endonukleázokkal való hasítással kapott és agarózgélén szétválasztott DNS-fragmensek etidium-bromidos festésével. 1. és 2. sáv: NotI-gyel emésztett WT és vp7; 3. és 4. sáv: HindIII-mal emésztett WT és vp7; 5. és 6. sáv: HindIII-mal és NotI-gyel kombináltan emésztett WT és vp7; 7. és 8. sáv: PstI-gyel emésztett WT és vp7; 9. és 10. sáv: PstI-gyel és NotI-gyel együtt emésztett WT és vp7; 11. és 12. sáv: SalI-gyel emésztett WT és vp7; 13. sáv: marker-DNS-ek (ligált és HindIII-mal emésztett  $\lambda$ -fág-DNS; és HaeIII-mal hasított  $\Phi$ X-fág). A bal oldali nyilak jelzik a fragmensek méretét kilobázispárban, az NotI-gyel emésztett WT vacciniában, a jobb oldali nyilak a markerek. Megjegyezzük, hogy az 1. és 2. sáv közel tízszer kevesebb DNS-t tartalmaz, mint a többi sávok.

Az 1.7 ábra mutatja az 1.6 ábrán látható gél Southern-blot-képét, próbaként gpt-gént alkalmazva. A nyilak jelzik a markerméreteket.

Az 1.8 ábra mutatja a fertőzött sejtekből nyert, NotI-gyel emésztett és vacciniavírus-próbával hibridizált vacciniavírus-DNS-ek Southern-blot-analízisét. 1–4. sáv: az A1–A4 jelzésű plakkokkal fertőzött sejtek DNS-e; 5–8. sáv: C1–C4 plakkok; 9–12 sáv: E1–E4 plakkok; 13. sáv: vad típusú vaccinia-DNS; 14. sáv: nem fertőzött CV–1 gazdasejtek DNS-e; 15. sáv:

marker-DNS-ek (HindIII-mal emésztett  $\lambda$ -fág-DNS; HaeIII-mal hasított  $\Phi$ X-fág).

Az 1.9 ábra mutatja ugyanazon minta Southern-blot-analízisét próbaként gpt-gént alkalmazva, mint amelynek elektroforetikus gélképét az 1.8 ábra mutatja. Az 1–12. sávok jelentése ugyanaz, mint az 1.8 ábrán; 13. sáv: fertőzetlen CV–1 gazdasejtek DNS-e; 14 sáv: vad típusú vaccinia-DNS; 15. sáv: marker DNS-ek (HindIII-mal emésztett  $\lambda$ -fág-DNS és HaeIII-mal hasított  $\Phi$ X-fág).

Az 1.10 ábra mutatja ugyanazon virális DNS-nek Southern-blot-analízisét PstI-gyel végzett hasítás után, próbaként gpt-gént alkalmazva, mint amelynek elektroforetikus gélképét az 1.8 ábra mutatja. 1–12. sáv: mint az 1.8 ábrán; 13. sáv: fertőzetlen CV–1 gazdasejtek DNS-e; 14. sáv: WT vaccinia-DNS; 15. sáv: marker-DNS-ek (HindIII-mal emésztett  $\lambda$ -fág-DNS, és HaeIII-mal hasított  $\Phi$ X-fág).

Az 1.11 ábra mutatja a vacciniavírus-DNS-ek módosított PstI „C”-fragmensének várható szerkezetét a gpt génkazetta egyszeri vagy kettős inzertálásával. P=PstI és N=NotI hasítási hely. A számok a megfelelő PstI fragmensek méretét jelölik; a vastagon írott számok azokat a fragmenseket jelzik, amelyek várhatóan hibridizálnak a gpt-gén-próbával. Nyilak jelzik a gpt-gén (800 bp) transzkripciójának irányát a vacciniavírus promotor (300 bp) irányítása alatt.

A 2.1 ábra mutatja rekombináns madárpoxvirus (szárnyaspoxvirus, FP)-genomok analízisét NotI restrikciós endonukleázzal való emésztéssel és 1%-os agarózgélén FIGE-elválasztással. 5. sáv: marker ( $\lambda$ -fág HindIII fragmens, nem hasított  $\lambda$ -fág és vaccinia WR); 1. és 2. sáv: HP1.441 szárnyaspoxvirus-DNS, nem hasított, illetve NotI-gyel hasított; 3. és 4. sáv: f-TK2a szárnyaspoxvirus-DNS, nem hasított, illetve NotI-gyel hasított.

A 2.2 ábra mutatja az idegen géneket expresszáló szárnyaspoxvirusok szerkesztését közvetlen molekuláris klónozással. A poxvirus promotor (P) szabályozása alatt álló E. coli gpt-gént tartalmazó génexpressziós kazettát NotI-gyel való hasítással kapott szárnyaspoxvirus (f-TK2a) DNS-ének jobb és bal karjához (ra, illetve la) ligáljuk. A pakolást helper-szárnyaspoxvírussal (HP2 törzs) végezzük csirkeembrió-fibroblasztokban.

A 3.1 ábra mutatja a módosított poxvirusok előállításának folyamatát extracelluláris genomszerkesztéssel és intracelluláris pakolással. Egy vacciniavírus promotor szabályozása alatti gpt-gént tartalmazó génkazettát ligálunk az egyetlen hasítási helyen SmaI endonukleázzal hasított vacciniavírus-DNS jobb karjával (ra) és bal karjával (la). A pakolást helper-szárnyaspoxvírussal (HP1.441 törzs) végezzük csirkeembrió-fibroblasztokban. P1=a 7,5 kD polipeptidet kódoló vacciniavírusgén promotere.

A 3.2 ábrán Southern-blot-analízissel bizonyítjuk, hogy a helper-szárnyaspoxvírussal pakolt, genetikailag módosított vacciniavírus-genomok a várt inzertált szakaszt az egyetlen SmaI hasítási helyen tartalmazzák. A fertőzött sejtekből izolált összes DNS-t HindIII-mal

emésztettük, és a blotot gpt-gén-próbával hibridizáltuk. 1–8. sáv: F12.2–F12.9 plakkokkal fertőzött sejtekből izolált DNS-ek; 9–13. sáv: F13.1–F13.5 plakkok; 14. és 15. sáv: fertőzetlen és vad típusú vacciniavírussal (WR) fertőzött sejtekből izolált DNS-ek HindIII-mal hasítva; 16. sáv: marker (HindIII-mal hasított  $\lambda$ -fág-DNS). A 8. sávban lévő DNS nem hibridizálódik, mivel az F12.9 számú vírusizolátum nem replikálódott.

A 3.3 ábra mutatja olyan módosított vacciniavírusok várható sématis szerkezetét, amelyek az egyetlen SmaI helyre inzertálva tartalmaznak egy génkaszettát, közelebből az egyetlen vagy kettős inszerciót tartalmazó vírusok módosított HindIII „A”-fragmenseit. H=HindIII restrikciós endonukleáz hasítási hely, S=SmaI restrikciós endonukleáz hasítási hely. A számok a HindIII fragmensek méretét jelzik, a kivastagított számok azokat a fragmenseket jelölik, amelyek várhatóan hibridizálnak a gpt-gén-próbával. A gpt-génkaszetta egy körülbelül 300 bp méretű vacciniavírus promotert tartalmaz, amelyet egy belső HindIII hely választ el a gpt-szekvenciától (mintegy 800 bp). A nyílak jelzik a gpt-gén transzkripciójának irányát.

A 4.1 ábra mutatja a módosított timidin-kináz (tk)-gént tartalmazó vacciniavírus-vektor (vdTK) szerkesztésének vázlatát. WR–WT=vacciniavírus (VV), vad típusú (WT) Western Reserve (WR) törzs. A 4.1A ábra mutatja a vacciniavírus-genom csak közvetlen molekuláris módosítását alkalmazó módszert, beleértve a nemkívánatos NotI és SmaI helyek nem jelölt delécióját is. A 4.1B ábra egy másik módszert mutat be, az NotI deléciójára marker rescue-módszert alkalmazva, vacciniavírussal és egy módosított plazmiddal. A 4.1C ábra az SmaI hely deléciójára egy másik módszert mutat be, mégpedig a marker rescue-technikát.

A 4.2 ábra mutatja olyan vacciniavírus-vektor (vdTK) szerkesztését, amelyben a timidin-kináz (tk)-gén egy többszörös klónozóhellyel van helyettesítve. A nyílak jelzik a vacciniavírus tk-gén (W–tk) transzkripciójának iniciálását és irányát pHindJ–1 plazmidba klónozott HindIII fragmensben. A tk-gént a bemutatott módon helyettesítettük, és a végső pHindJ–3 plazmidot alkalmaztuk a módosított HindIII fragmens vacciniavírusba való inzertálására.

A 4.3 ábra illusztrálja a pA1 és pA2 plazmidok szerkesztését, amelyek prekuzorként használhatók a génexpressziós kazetták megszerkesztésére egy promotor és egy nyitott leolvasási keret inzertálásával. Az ilyen kazetták alkalmasak a vdTK vacciniavírus-vektorba való közvetlen molekuláris bevitelre irányított (erőszkolt) klónozás alkalmazásával.

A 4.4 ábra szemlélteti az olyan génexpressziós kazettát tartalmazó pA1–S1 és pA2–S1 plazmidok megszerkesztését, amely alkalmas a nyitott leolvasási keret szintetikus poxvirus promoterral (S1) és egy transzlációs startkodonnal való összekapcsolására. A kazettákat vdTK vacciniavírus-vektorba irányított klónozással való közvetlen molekuláris bevitelre terveztük. Az S1 promotor a két plazmidban eltérő orientációban van jelen, amint azt a transzkripció irányát mutató nyílak jelzik.

A 4.5 ábra mutatja az olyan génexpressziós kazettákat tartalmazó pA1–S2 és pA2–S2 plazmidok megszerkesztését, amelyek alkalmasak egy transzlációs startkodont már tartalmazó nyitott leolvasási keretek összekapcsolására egy szintetikus poxvirus promoterral (S2) a vdTK vacciniavírus-vektorba irányított klónozással való közvetlen molekuláris bevitel megelőzően. Az S2 promotor a két plazmidban eltérő orientációban van jelen, amint azt a transzkripció irányát mutató nyílak jelzik.

A 4.6 ábra mutatja a pN2–gpta és pN2–gptb plazmidok megszerkesztését.

A 4.7 ábra mutatja az olyan génexpressziós kazettákat tartalmazó pN2gpt–S3A és pN2gpt–S4 plazmidok megszerkesztését, amelyek alkalmasak egy transzlációs startkodont tartalmazó (S4) vagy azt nem tartalmazó (S3A) nyitott leolvasási keret összekapcsolására egy szintetikus promoterral (S3A vagy S4) a vdTK vacciniavírus-vektorban lévő egyetlen helyre való közvetlen molekuláris bevitel megelőzően. A rövidítések azonosak az 1.3 ábrával kapcsolatban megadottakkal.

Az 5.1 ábra mutatja a pA1S1–PT génexpressziós kazetta plazmid megszerkesztését humán protrombin vdTK vacciniavírus-vektorban való expresszáására. A rövidítések jelentése azonos az 1.3 ábrán megadottakkal. A nyílak a transzkripció irányát jelzik.

Az 5.2 ábra mutatja a pN2gpt–GPg génexpressziós kazetta plazmid megszerkesztését humán glu-plazminogén expresszáására vdTK vacciniavírus-vektorban. S4=sintetikus poxvirus promotor; a többi rövidítés jelentése azonos az 1.3 ábrán megadottakkal.

Az 5.3 ábra mutatja a pN2gpt–LPg génexpressziós kazetta plazmid megszerkesztését humán lys-plazminogén expresszáására vdTK vacciniavírus-vektorban. A rövidítések jelentése azonos az 1.3 ábrán megadottakkal.

Az 5.4 ábra mutatja a pN2gpt–gp160 génexpressziós kazetta plazmid megszerkesztését humán vírusantigén (HIV-gp160) expresszáására vdTK vacciniavírus-vektorban. A rövidítések jelentése azonos az 1.3 ábrával kapcsolatban megadottakkal.

Az 5.5 ábra mutat egy módszert közvetlen molekuláris klónozással előállított módosított vacciniavírusok vizsgálatára, amely egy markergén (E. coli lacZ-gén) egyidejű inzertálásán alapul, ez a markergén egy szemmel látható megkülönböztető fenotípust biztosít (kék plakk, szemben a lacZ-gén nélküli vírusok fehér plakkjával).

Az 5.6 ábra mutatja a pTzS4–lacZa és pTzS4–lacZb plazmidok szerkesztését.

A 6.1 ábra mutatja a vS4 vacciniavírus-vektor megszerkesztését, amely egy erős, késői vacciniavírus promotor (S4) kontrollja alatt álló, irányított „mester”-klónozóhellyel rendelkezik.

A 6.2 ábra mutatja a vWVF módosított vacciniavírus megszerkesztését a von Willebrand-faktor expresszáására egy nyitott leolvasási keret vS4 vacciniavírus-vektorba való közvetlen molekuláris inzertálásával. vWVF=von Willebrand-faktor-cDNS. A nyíl jelzi a transzkripció irányát az S4 promoterből.

A 7.1 ábra mutatja a hozzáadott DNS mennyiségének hatását a vacciniavírus-DNS pakolására segítő

szárnyaspoxyvírussal CV-1 emlőssejtekben, amelyben a szárnyaspoxyvírus nem teljesen replikálódik. Öt tenyészetet szárnyaspoxyvírussal fertőztünk, és ezt követően a megadott mennyiségű vacciniavírus-DNS-sel transzfektáltuk. Az első oszlop egy olyan tenyészetet mutat, amelyhez nem adtunk sem DNS-t, sem szárnyaspoxyvírust, az ötödik oszlop egy olyan tenyészetet mutat, amelyhez nem adtunk DNS-t, de szárnyaspoxyvírussal fertőztük.

A 8.1 ábra mutatja gazdaspecifikus mutációkkal rendelkező segítő vírusként alkalmazható vacciniavírus (vdhr) szerkesztését, amely megakadályozza bizonyos humán sejtvonalakban a replikációt. hr-gén=gazdaspecifikus gén, amely a vacciniavírus EcoRI K fragmensében lokalizálódik; az egyéb rövidítések magyarázata az 1.3 ábrával kapcsolatban megadott.

A 9.1 ábrán látható a pS2gpt-P2 és pP2gp160MN plazmidok szerkesztése. A plazmidokon belüli nyilak mutatják a megfelelő gének transzkripciójának irányát.

A 9.2 ábrán látható a vP2-gp160MNA és vP2-gp160MNB vírusok szerkesztésének sematikus vázlata.

A 9.3 ábrán látható a vad típusú vacciniavírus PstI E fragmensének és a gp160 génet tartalmazó kiméravírusok PstI fragmenseinek géntérképe. A nyilak jelzik a gp160 gén transzkripciójának irányát. A számok jelölik a fragmensek méretét kilobázispárban.

A 9.4 ábra mutatja a pselP-gpt-L2 plazmid szerkesztését. Nyilak jelölik a megfelelő gének transzkripciójának irányát.

A 9.5 A) ábra mutatja a pselP-gp160MN plazmid szerkesztését és a 9.5 B) ábra mutatja a vad típusú gének (szekvenciaazonosítási száma: 73.) és a módosított gp160 gének (szekvenciaazonosítási száma: 75.) transzlációs startkodonjai környezetének szekvenciáit.

A 9.6 ábra mutatja a vselP-gp160MNA és vP2-gp160MNB kiméra-vacciniavírusok szerkesztését sematikus formában. Nyilak jelölik a gp160 gén transzkripciójának irányát.

A 9.7 ábrán látható a vad típusú vacciniavírus SalI F fragmensének és a vselP-gp160MNA és vP2-gp160MNB kiméra-vacciniavírusok SalI fragmenseinek képe. Nyilak jelölik a gp160 gén transzkripciójának irányát. A számok a fragmensek méretét jelentik kilobázispárban.

A 10.1 A) ábra része mutatja a pN2-gptProtS plazmid szerkezetét. A vaccinia P7,5 promotor (P7,5) által szabályozott gpt-génből és egy szintetikus poxyvírus promotor (selP) által szabályozott humán S-protein-génből (huProtS) álló kettős génkazzettát NotI restrikciós helyek határolják. A 10.1 B) ábra mutatja a vad típusú S-protein-gén (77. azonosítású számú szekvencia), illetve a kimérákban lévő S-protein-gén (79. azonosítású számú szekvencia) transzlációs startkodonja körüli szekvenciákat.

A 10.2 ábrán látható az S-protein-gént hordozó kiméra-vacciniavírusok Southern-blot-analizise. Az ábra A) részén látható a SacI-gyel emésztett és vad típusú vaccinia SacI fragmensével hibridizált összes celluláris DNS Southern-blotja. Az ábra B) része ugyanezen

anyag képét mutatja NotI-gyel végzett emésztés és humán S-protein-szekvenciákkal való hibridizálás után. Az ábra C) részén látható sematikus formában a vad típusú SacI I fragmens és a kiméra SacI fragmens az inzert ligálása után.

A 10.3 ábrán látható a plazmából származó S-protein (pdProtS) Western-blot-analizise (1. és 2. sáv) és a rekombináns S-protein (rProtS) Western-blotja. SK Hepl sejtek tenyészetének felülúszóiból 10 µl-eket vizsgáltunk 4–72 órán át tartó inkubációs periódus után.

A 11.1 ábra mutatja a pN2gpt-Flx plazmid szerkezetét. A vaccinia P7,5 promotor (P7,5) által szabályozott gpt-génből és egy szintetikus poxyvírus promotor (selP) által szabályozott humán IX faktor génből álló kettős génkazzettát NotI restrikciós helyek határolják.

A 11.2 ábrán látható a humán IX faktort kódoló gént hordozó kiméravírusok Southern-blot-analizise. Az ábra A) része: összes celluláris DNS-SfuI-gyel emésztve és humán IX faktor génpróbával hibridizálva (plazmid pBluescript-Flx). Mind a nyolc izolátum (1–6., 9. és 10.) és az inzertált szakasz is „a” orientációjú; m=marker; VV-WT/WR=vad típusú vaccinia WR-törzs. Az ábra B) része: kiméravírusok várható genomális szerkezete.

A 11.3 ábra mutatja a plazmából származó IX faktor (pdFIX, 1. és 2. sáv) és a kiméra-vacciniavírussal Vero-sejtekben expresszált rekombináns IX faktor Western-blot-analizisét. A sejtenyészetek felülúszójából 10 µl-eket vizsgáltunk 72 órás inkubáció után. 1–6., 9. és 10. =izolált plakkok számjele; pd FIX=plazmából származó IX faktor.

A 12.1 ábra mutatja az f-envIIIB kiméra-szárnyaspoxyvírus szerkesztését egy HIBIIIB env-gén közvetlen molekuláris klónozásával.

A 12.2A ábrán látható az inzertált env-gén orientációt mutató kiméra-szárnyaspoxyvírus izolátumok SspI fragmenseinek Southern-blot-analizise. 1–12. sáv: f-LFa-1 vírusizolátumok; 13. és 14. sáv: HP1,441 és f-TK2a (negatív kontroll); 15. sáv: pN2gpt-gp160 SspI-gyel való emésztésével kapott termék (10 ng, pozitív kontroll).

A 12.2B ábra mutatja a kiméra-szárnyaspoxyvírusba két lehetséges orientációban inzertált SspI fragmensek restrikciós térképét. A számok az SspI fragmensek méretét jelentik kilobázispárban. A nyilak jelölik az inzertált szakaszok orientációját, amely megegyezik a gp160 transzkripciós egység transzkripciójának irányával.

A 12.3 ábra mutatja a HIV-burok-glikoproteinek expresszióját csirkeembrió-fibroblasztokban Western-blot-analízissel. 1–8. sáv: f-LF2a-h vírusizolátumok; 9. és 15. sáv: gp160 standard (A. Mitterer Immuno AG, Orth/Donau, Ausztria) 10–13. sáv: f-LF2i-1 vírusizolátumok; 14. sáv: markerproteinek; 16. és 17. sáv: HP1.441 és f-TK2a szárnyaspoxyvírus (negatív kontroll).

A 12.4 ábra mutatja a fertőzött csirkeembrió-fibroblasztokban kiméra-vacciniavírusok által termelt HIV-gp41 kimutatását Western-blottal. 1–8. sáv: f-LF2a-h vírusizolátumok; 9. és 15. sáv: gp160 standard; 10–13. sáv: f-LF2i-1 vírusizolátumok; 14. sáv:

markerproteinek; 16. és 17. sáv: HP1.441 és f-TK2a szárnyaspoxvírus (negatív kontrollok).

A találmány egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus, például egy poxvírus módosított genomjának teljesen egy élő sejt korlátain kívüli első felépítését képviseli. Ezt a felépítést egy izolált virális genomiális DNS alkalmazásával hajtjuk végre, amelyet egy szekvencia-specifikus endonukleázzal hasítunk, majd egy idegen DNS-sel újra ligálunk. A kapott módosított DNS-t ezután fertőző poxvírusvirionokba pakoljuk segítő vírusként szolgáló másik poxvírussal fertőzött gazdasejtekbe való transzfektálással.

A találmány eltérő stratégiákat tesz lehetővé vektorok előállítására eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusokból, mint amelyeket korábban más DNS-vírusokra alkalmaztak különféle géntechnológiai problémák megoldására. Így például ez a közvetlen klónozási eljárás lehetővé teszi olyan gének közvetlen klónozását citoplazmatikus DNS-vírusokba, például poxvírusokba, amelyek nem klónozhatók bakteriális rendszerekben vagy azért, mert túl nagyok a bakteriális vektorok számára, vagy azért, mert túl toxikusak a baktériumokra nézve, vagy a baktériumokban instabilak. A közvetlen molekuláris klónozás nagyobb pontosságot tesz lehetővé a géntechnológiai úton előállított virális genomok szerkesztése során, és optimális körülmények között növelheti a klónozás sebességét, valamint egyetlen ligálási reakcióban többféle terméket eredményezhet, amelyek eltérő orientációban több inzertált szakaszt tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik az idegen gén optimális expresszióját biztosító szerkezetek gyors kiszűrését.

A leírásban eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus alatt iridovírusokat és poxvírusokat értünk. Az iridovírus alatt az Iridoviridae család tagjaként osztályozott vírusokat értjük, például az afrikai disznólázvírust, valamint bizonyos kétéltű- és rovarvírusokat. Poxvírus alatt a Poxviridae család tagjaként definiált vírusokat értjük, például a Chordopoxviridae alcsaládba (meleg vérvű poxvírusok) és a Entomopoxviridae alcsaládba (rovarpoxvírusok) tartozó vírusokat [lásd például B. Moss: B. N. Fields, D. M. Knipe és munkatársai, Virology 2080 (Raven Press, 1990)]. A chordopoxvírusok körébe tartoznak többek között az alábbi nemek, amelyek közül közelebbi példákat is tárgyalunk a leírásban, ezeket zárójelekben jelöltük: Orthopoxvírus (vaccinia); Avipoxvírus (szárnyashimlő); Capripoxvírus (birkahimlő); Leporipoxvírus [nyúl (Shope)-fibróma, myxoma]; és Suipoxvírus (sertéshimlő). Az entomopoxvírusoknak három nemzetségük van: az A, B és C.

A találmány egyik tárgya egy eljárás módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus előállítására egy módosított citoplazmatikus DNS-vírus-genom közvetlen molekuláris klónozásával. Ez az eljárás abból áll, hogy egy módosított citoplazmatikus DNS-vírus-genomot tartalmazó módosított DNS-molekula előállítása céljából egy első citoplazmatikus DNS-vírus-genomot tartalmazó tisztított DNS-molekulát extracelluláris körülmények között módosítunk.

A találmány szerinti módosításra alkalmas tisztított DNS-molekula például úgy állítható elő, hogy vírusre-

szecskéből genomiális DNS-t izolálunk a genomiális DNS-eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusokból való izolálására alkalmas ismert eljárásokkal, lásd például az 1. példát. A tisztított DNS-molekulák némelyike vagy akár mindegyik előállítható molekuláris klónozással vagy kémiai szintézissel is. Egy virális genomot tartalmazó tisztított DNS-molekula találmány szerinti módosítása abból áll, hogy ennek a genomnak a DNS-szekvenciájában örökletes változásokat idézünk elő. Ilyen változások például egy DNS-szekvencia inzertálása ebbe a genomba, egy DNS-szekvencia delécioja ebből a genomból, vagy ebben a genomban lévő DNS-szekvencia helyettesítése egy másik DNS-szekvenciával. Az inzertált, törölt vagy helyettesített DNS-szekvencia, amely egyetlen DNS-bázispárból vagy egynél több DNS-bázispárból áll.

A találmány fenti szempontja szerint az első DNS-vírus-genomot tartalmazó DNS-molekula módosításának lépése bármely olyan módszerrel végrehajtható, amely alkalmas egy DNS-molekula szekvenciájának extracelluláris módosítására. Így például a találmány szerinti DNS-molekula módosítása magában foglalja a tisztított DNS-molekula módosítását egy fizikai mutagénnel, például ultraibolya fénnel vagy egy kémiai mutagénnel. A tisztított DNS-molekulák extracelluláris mutagenézisének számos módszere jól ismert a génsebészeti módosítások területén.

Másik kiviteli alak szerint a DNS-molekula módosításának lépése DNS-szegmensek összekapcsolásából áll, amellyel egy módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekulát alakítunk ki. A fenti megoldás egyik kivitelezési módja szerint a módosított DNS-molekula kialakítására egymással összekapcsolt DNS-szegmensek közül néhányat vagy mindegyiket az első vírusgenomot tartalmazó DNS-molekula-nukleázzal, előnyösen egy szekvenciaspecifikus endonukleázzal való hasításával állítjuk elő. A módosított DNS-molekula kialakítására egymással összekapcsolt DNS-szegmensek közül némelyiket vagy mindegyiket kémiai szintézissel is előállíthatjuk jól ismert módszerek alkalmazásával.

Bizonyos kiviteli módok szerint a módosított DNS-molekula előállítására a DNS-szegmensek egymáshoz kapcsolását a fenti DNS-szegmensek extracelluláris ligálásával hajtjuk végre, például egy bakteriális vagy bakteriofág-ligáz alkalmazásával a jól ismert rekombinációs DNS-módszerek szerint. Adott esetben ez a DNS módosítási lépés tartalmazza az első vírusgenomot tartalmazó, DNS-molekula hasításával kapott DNS-szegmensek végeinek egy foszfáttal, például borjúbél-foszfáttal való kezelését is. Ez az enzim eltávolítja a foszfátmaradékokat, és ezáltal megakadályozza a DNS-molekula hasításával kapott egyik DNS-szegmens újraligálását egy másik ilyen szegmennel.

A DNS-szegmensek összekapcsolásának másik módszere az, hogy a DNS-szegmensek némelyikét vagy mindegyikét olyan ragadós végek extracelluláris illesztésével kapcsoljuk össze, amelyek megfelelő hosszúságúak ahhoz, hogy a módosított DNS-molekula képes legyen transzfektálni egy gazdasejtet, ahol

is az összeillesztett DNS-szegmensek ligálása végbe-  
megy.

A módosított DNS-molekula előállítására az előbbi  
módszer egy másik kiviteli módja szerint az első vírus-  
genomot tartalmazó DNS-molekula módosítását úgy vé-  
gezzük, hogy az első vírus genomiális DNS-moleku-  
lájának hasításával kapott legalább néhány DNS-szeg-  
menst kapcsoljuk össze egy további DNS-szegmennyel.  
A fenti módszer egy előnyös megvalósítása szerint a  
genomiális virális DNS-molekula hasítását egy szek-  
venciaspecifikus endonukleázzal végezzük az első ví-  
rusgenomban lévő egyetlen hasítási helyen, ezáltal a  
genomiális vírus-DNS-nek két DNS-karját állítjuk elő.  
A két kart azután egy érdekes szekvenciát tartalmazó  
idegen DNS-sel ligáljuk össze.

A leírásban érdekes DNS-szekvencia alatt a vírus  
DNS-karokkal ligált olyan idegen DNS-szegmens szek-  
venciáját értjük egyik esetben, amely egy eukarióta  
citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes kö-  
rülmények között nem fordul elő. Az érdekes DNS-  
szekvencia másrészt olyan szekvenciát tartalmazhat,  
amely egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genom-  
jában természetes körülmények között előfordul, de  
olyat is, amely természetes körülmények között nem for-  
dul elő egy ilyen genomban. Ezenkívül az érdekes szek-  
vencia tartalmazhat csak olyan szekvenciákat, amelyek  
eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusban természetes  
körülmények között előfordulnak, de ez a szekvencia  
ennek a citoplazmatikus DNS-vírusnak a genomjába  
olyan helyzetben van inzertálva, amely különbözik a  
szekvencia természetes helyzetétől. Ezenkívül a termé-  
szetben előforduló érdekes virális szekvencia inzertá-  
lása egyik DNS-vírusból egy másikba, vagy egy bizo-  
nyos virális genom egyik részéből ennek a genomnak  
egy másik részébe, szükségszerűen egy olyan szekven-  
ciát eredményez, amely a találmány értelmében egy  
citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes kö-  
rülmények között nem fordul elő a virális genom és az  
inzertált érdekes virális szekvencia csatlakozásánál.

A genomiális vírus-DNS két karjához ligált idegen  
DNS-szegmens olyan végeket tartalmaz, amelyek a  
virális DNS karjainak végeivel a ligálás szempontjából  
összeférhetők. Az összeférhető végek komplementer ra-  
gados végek vagy tompa végek lehetnek. A fenti mód-  
szer ligálási lépésének eredményeként olyan módosi-  
tott DNS-molekulát kapunk, amely az első vírusgeno-  
mot tartalmazza, amelybe az egyetlen hasítási helyen  
az idegen DNS DNS-szekvenciája van inzertálva.

Az eljárásnak ezt a megvalósítási módját – amely-  
ben egy DNS-szekvenciát inzertálunk az első vírus  
genomjába – a leírásban többek között azzal az eljárás-  
sal szemléltetjük, amelyben egy vacciniavírus-genom-  
ba illesztünk egy génexpressziós kazettát az NotI vagy  
SmaI bakteriális restrikciós endonukleázok egyetlen ha-  
sítási helyén, amint azt az 1., illetve a 3. példában leír-  
tuk. Ezt az eljárást szemlélteti ezenkívül a 2. példa is,  
amelyben egy génkazettát inzertálunk egy rekombináns  
szárnyaspoxvírus-vektor genomjába, a rekombináns  
szárnyaspoxvírus-genomban lévő bakteriális gén szek-  
venciájában lévő egyetlen NotI helyre.

Egy idegen DNS inzertálása egy eukarióta citoplaz-  
matikus DNS-vírus-genom egyetlen hasítási helyére a  
találmány értelmében egy kívánt protein, főleg egy hu-  
mán protein expresszállásának céljára használható. Így  
például az 5. példában ismertetjük a plazminogént,  
protrombint és a humán immunhiányvírus glikoprotein  
160-at (HIV-gp 160) kódoló gének inzertálását egy  
vacciniavírus-vektor egyetlen hasítási helyére és a ka-  
pott módosított vacciniavírusok alkalmazását a fenti  
proteinek termelésére. Az idegen proteinek előállíthat-  
juk sejtenyészetekben, és így tisztított proteinek ka-  
punk, vagy közvetlenül egy humán vagy állati gazda-  
szervezetben abból a célból, hogy a gazdát egy talá-  
lmány szerinti módosított vírust tartalmazó vaccinnal  
immunizáljuk.

Bizonyos megvalósítási módokban a virális genom-  
DNS-szekvencia inzertálása általi módosítása egy mar-  
kergénfunktio bevezetéséből vagy eltávolításából áll a  
módosított vírusgenom első vírusgenomtól való megkü-  
lönböltetésére. A fenti megvalósítási mód egyik válto-  
zata szerint az első vírusgenomba inzertált DNS-szek-  
vencia egy szelektív markerként tartalmaz, és az első  
gazdasejtben termelődött fertőző módosított poxví-  
rus-virionok visszanyerése abból áll, hogy a fenti fertő-  
ző virionokkal egy második gazdasejtet fertőzünk a sze-  
lektív markerként expresszálló poxvírusgenomokra való  
szelektálás körülményei között. A találmány szerinti  
fenti megoldás egyik előnyös kivitelezése szerint a sze-  
lektív markerként expressziója a második gazdasejtben  
a második gazdasejtnél egy citotoxikus hatóanyaggal  
szembeni rezisztenciát kölcsönöz. Ez a hatóanyag a má-  
sodik gazdasejt fertőzése során olyan mennyiségben  
van jelen, amely elegendő a szelektív markerként exp-  
resszálló poxvírusgenom szelektálására. Ebben az eset-  
ben a hatóanyag által szelektáljuk az inzertált szelektív  
markerként tartalmazó módosított vírusgenomokat, és  
kizárjuk azokat a genomokat, amelyekben ez a marker-  
gén nincs jelen.

A módosított virális genom első virális genomtól  
való megkülönböztetésére egy szelektív markerként  
inzertálása egy DNS-szekvenciába különösen hasznos  
abban az esetben, ha az első vírus genomiális DNS-  
molekuláját az egyetlen hasítási helyen hasítottuk, és  
ezért az így kapott virális DNS-karok hajlamosak a kí-  
vánt DNS-szekvencia inszerciója nélkül is újraligálódní.  
Ez a megoldás azzal az eljárással van példászerűen  
bemutatva, amikor az *Escherichia coli* xantin-guanin-  
foszforibozil-transzferáz enzimet kódoló (továbbiak-  
ban gpt) gént inzertáljuk például egy vacciniavírus-  
genomba vagy egy szárnyaspoxvírus-genomba az  
egyetlen NotI helyen, amint azt az 1. és 2. példában is-  
mertetjük.

Azt a módszert, amikor a módosított virális genom  
első genomtól való megkülönböztetésére eltávolítunk  
egy markergénfunktio, a 2. példával szemléltetjük. Eb-  
ben a példában egy galaktozidáz kódoló *E. coli* lacZ-  
génben lévő NotI helyre illesztünk be egy idegen DNS-  
szekvenciát a szárnyaspoxvírus-genomba. Amint azt a  
2. példában leírjuk, egy DNS-szekvencia inzertálása  
erre a helyre megbontja a lacZ-gén kódolószekvenciá-

ját, és ezáltal megakadályozza a  $\beta$ -galaktozidáz termelődését. Az előbbi enzim expressziója ennek következtében egy kék plak- fenotípust eredményez a lacZ-gént hordozó vírusokban. Ennek megfelelően az a módosított virális genom, amely erre a helyre inszertálva egy DNS-szekvenciát hordoz, fehér plak- fenotípust eredményez, amely megkülönbözteti a módosított vírust az első vírustól. A találmány szerinti eljárás egy másik kiviteli módja szerint egy működőképes *E. coli* lacZ-gént egy másik érdekes génnel együtt viszünk be a vektorba azért, hogy ez a kívánt inszertált szakaszt tartalmazó módosított vírusok markereként szolgáljon.

A találmány szerinti eljárás egy további kiviteli módja szerint a DNS-molekula módosításának lépése egy szekvenciaspecifikus endonukleáz számára egy új hasítási hely bevezetését jelenti az első vírusgenomban. Ennek a megvalósítási módnak egyik példája az, amikor egy első poxvírusgenomban lévő egyetlen hasítási helyre egy szintetikus DNS-linkert tartalmazó idegen DNS-t inszertálunk, amint azt a 6. példában ismertetjük. Ez a linker egy többszörös klónozóhelyet tartalmaz, amelyben számos, egymással szorosan szomszédos hasítási hely van, amelyek alkalmasak idegen DNS inzertálására a módosított poxvírusgenomba. A többszörös klónozóhelyen lévő hasítási helyek előnyösen nincsenek jelen az első virális genomban, és ezért a módosított virális genomban ezek egyetlen ilyen helyek.

Közelebbről egy első virális genomot tartalmazó DNS-molekula módosításának lépése magában foglalja egy DNS-szekvencia inzertálását is egy szekvenciaspecifikus endonukleáz valamely első és valamely második hasítási helye közé. Az egyik ilyen megvalósítási mód szerint az első virális genom egy többszörös klónozóhelyet tartalmaz, amelyben olyan hasítási helyek vannak, amelyek egyedülállóak az első virális genomban. A fenti eljárás szerint egy első virális genomot tartalmazó DNS-molekula hasítása a többszörös klónozóhelyben lévő két ilyen egyedülálló helyen két ragadós végű virális DNS-kart eredményez, amelyek nem kompatibilisek az egymással való ligálódás szempontjából. A többszörös klónozóhelyben lévő két egyetlen hasítási hely közötti DNS-szegmenst a hasított virális DNS-karoktól például a fenti karok etanolos kicsepásával választjuk el, amint azt az 5. példában egy humán protrombingén módosított poxvírusvektorba való inzertálására ismertettük.

Egy DNS-szegmens két egyetlen hasítási hely közötti inzertálása egy virális genomba a vektor karjaival való ligálásra kompatibilis ragadós végeket tartalmazó DNS-inzertek kényszerített klónozására alkalmazható. Más szavakkal ez a módszer – amely szerint a virális DNS-t két helyen hasítjuk – alkalmas a virális DNS-karok ligálásából származó virális genomok hozamának növelésére ahhoz képest, amikor a karokat a virális DNS egyetlen helyen való hasításával állítjuk elő, mivel az utóbbi módszerrel előállított karok nem tartalmaznak a ligálás szempontjából kompatibilis végeket. Ez a kényszerített klónozási módszer a módosított virális genomba inzertált DNS orientációját is irányítja, mivel

csak az egyik vírus-DNS-kar kompatibilis a ligálás szempontjából az inzertált DNS mindkét végével.

A találmány szerinti kényszerített klónozási módszert például az 5. példában szemléltetjük, amikor egy humán protrombingént tartalmazó génexpressziós kassetát illesztünk egy vacciniavírus-vektor többszörös klónozási helyére.

Egy előnyös kiviteli alak szerint az első virális genomban a két egyedi hasítási hely közötti közbenső DNS-szegmens nem esszenciális az első virális genom replikációja szempontjából, ezért a fenti szekvencia törlése vagy másik DNS-szegmennel való helyettesítése nem akadályozza meg a kapott módosított genom replikációját. A közbenső DNS-szegmenst olyan DNS-szegmennel is helyettesíthetjük, amely a közbenső szekvencia virális replikáció szempontjából esszenciális részét tartalmazza egy olyan további DNS-szekvenciához kapcsolva, amelyet az első vírusgenomba akarunk inzertálni.

A találmány szerinti eljárás másik megvalósítási módja szerint az első vírusgenom módosítása egy szekvenciaspecifikus endonukleáz nemkívánatos hasítási helyének eltávolításából áll. A fenti típusú módosításokat kívánt esetben többször is elvégezhetjük például azért, hogy ugyanazon nukleáz számára a redundáns hasítási helyeket töröljük, ezáltal egy adott nukleáz számára egyetlen hasítási helyet tartalmazó módosított vírusgenomot állítsunk elő végső soron.

Azok a módszerek, amelyek különösen alkalmasak egy hasítási hely eltávolítására egy vírusgenomból, a szakemberek számára jól ismertek. Idetartoznak a különbözőféle általános, helyspecifikus mutagenézis-módszerek. Egy endonukleáz hasítási hely vírusgenomból való eltávolításának egyik közelebbi módszere a genomiális vírus-DNS extracelluláris kezéséből áll, amellyel szelektáljuk azokat a mutáns genomiális DNS-molekulákat, amelyek rezisztensek a kérdéses endonukleáz általi hasítással szemben.

Egy hasítási hely vírusgenomból való eltávolításának másik módszere az, hogy egy hasított virális DNS-molekulát egy DNS-szegmennel, például egy szintetikus DNS-szegmennel ligálunk, amely egy, a hasított virális DNS-sel való ligálásra alkalmas véget tartalmaz, de hiányzik belőle azon nukleázfelismerő szekvenciájának egy része, amely a virális DNS-t hasította. Ebben az eljárásban a virális DNS-t hasító szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helye egy olyan nukleázfelismerő szekvenciát foglal magában, amely túlnyúlik a ragadós végeket tartalmazó szekvenciákon a ragadós végekkel közvetlenül szomszédos szekvenciákba. A szintetikus inzert ragadós végeket tartalmaz, amelyek kompatibilisek az egyetlen helyen hasított virális DNS-karokkal való ligálással. Azonban a szintetikus inzert egyik ragadós végével közvetlenül szomszédos szekvencia eltér attól a felismerőszekvenciától, amely azon enzim általi hasításhoz szükséges, amely a virális DNS-t hasította. Ezért a szintetikus DNS ezen végének ligálása egy vírussal nem képez funkcionális hasítási helyet azon nukleáz számára, amely a virális DNS-t hasította. Egy hasítási hely virális genomból való eltá-

volításának ezen módszerét a 4. példában ismertetjük, amikor is egy többszörös klónozóhelyet tartalmazó szintetikus DNS-szegmenst inzertálunk egy virális genom egyetlen hasítási helyére.

A virális genom módosítás következtében való inaktiválódásának megakadályozására nyilvánvaló, hogy egy virális genom találmány szerinti módosítását a virális genom azon régiójában kell végrehajtani, amely a vírus sejt kultúrában való szaporodásához nem esszenciális a kapott módosított vírus szaporítására alkalmazott körülmények között. A DNS-vírusok sejtenyészeten való szaporodásához nem esszenciális, egyébként találmány szerinti módosításra alkalmas szekvenciákat tartalmazó genomiális régiói többek között a gének közötti szekvenciák (azaz intergén régiók) lehetnek, valamint azon génszekvenciák, amelyek a módosított virális genom szaporodásához nem szükségesek.

Egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus kiválasztott genomjának találmány szerinti módosítására alkalmas nem esszenciális helyet például úgy azonosíthatunk, hogy végrehajtjuk a kívánt módosítást, és meghatározzuk, hogy ez a módosítás zavarja-e a genom replikációját a kívánt fertőzési körülmények között. Még közelebbről egy virális genomban lévő restrikciós enzimhasítási helyeket – beleértve az egyedi ilyen helyeket is ebben a genomban – úgy azonosítjuk, hogy a genomiális DNS-t emésztjük, és a kapott fragmenseket analizáljuk a szakemberek számára jól ismert módszerek alkalmazásával. Egy rövid szintetikus DNS-szakasz találmány szerinti közvetlen klónozási módszerrel való kísérleti inzertálásával egy választott hasítási célhelyre a genomot szétroncsolhatjuk. A választott célhelyen kísérleti inzertet tartalmazó vírus visszanyerése közvetlen bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a célhely a genom egy nem esszenciális régiójában van. Ha nincs alkalmas hasítási hely egy adott genomiális célterületen, egy ilyen helyet ki lehet alakítani vagy közvetlen molekuláris klónozás, vagy hagyományos, marker rescue technikákon alapuló génszerkesztési eljárások alkalmazásával. Ebben az esetben a célterületen inzertált hasítási helyet tartalmazó vírus sikeres visszanyerése közvetlenül jelzi, hogy a célterület egy nem esszenciális régióban van, amely a találmány szerinti módosításra alkalmas.

A találmány szerinti eljárás kivitelezésére alkalmas nem esszenciális genomiális régiókat poxvírusok esetében például Goebel és munkatársai ismertették [Virology 179, 247–266 (1990), 1. táblázat], így ezeket a fenti irodalmi helyre való hivatkozással ismertetjük.

A találmány szerinti eljárás további kiviteli módja szerint az első virális genomba inzertált DNS-szekvenciának legalább egy része egy promoter transzkripció szabályozása alatt áll. Bizonyos kiviteli módokban ez a promoter abban a DNS-szekvenciában lokalizálódik, amelyet az első virális genomba inzertáltunk, és ezért az inzertált DNS-szekvencia azon részének transzkripcióját szabályozza, amely a promoter után (5' → 3' irányban) helyezkedik el. Ezt a megoldást egy olyan génkazetta poxvirusgenomba való inzertálásával szemléltetjük, amely génkazetta egy nyílt leolvasási ke-

rethez funkcionálisan kapcsolt promotert tartalmaz, amint azt az 1–5. példákban ismertetjük.

Egy másik előnyös kiviteli mód szerint az első virális genomba inzertált DNS-szekvencia transzkripcióját szabályozó promoter a módosított virális genomban az inzertált DNS-szekvencia előtt (3' → 5' irányban) helyezkedik el. Ezt a megoldást a humán von Willebrand-faktor proteint kódoló cDNS többszörös klónozóhelybe való inzertálásával szemléltetjük, amely egy 3' → 5' irányban lévő promoterhez van funkcionálisan kapcsolva egy vacciniavírus-vektorban, amint azt a 6. példában ismertetjük.

Egy bizonyos kiviteli mód szerint az inzertált DNS-szekvenciát szabályozó promotert egy, a módosított virális genom által kódolt RNS-polimeráz felismeri. Ezt a promotert más esetben egy másik genom, például egy másik vírus vagy celluláris genom által kódolt RNS-polimeráz ismeri csak fel. Ez az RNS-polimeráz például egy T7 bakteriofág-polimeráz lehet, amelyet egy másik citoplazmatikus DNS-vírus-genom vagy egy módosított gazdasejt genomja kódol. A T7 polimeráz és promotert például rekombináns poxvírusokban alkalmazták egy inzertált DNS-szekvencia expressziójának fokozására [például Fuerst, T. R. és munkatársai, J. Mol. Biol. 205, 333–348 (1989)]. A T7 RNS-polimeráznak külön genomban való biztosítása alkalmas arra, hogy megakadályozzuk a módosított poxvirusgenomba inzertált DNS-szekvencia expresszióját azon esetektől eltekintve, amikor ez a külön genom jelen van.

Egy további kiviteli mód szerint az inzertet szabályozó promoter alkalmas a transzkripció valamely citoplazmatikus DNS-vírus RNS-polimeráz általi iniciálására. Bizonyos esetekben a promoter egy természetben előforduló virális promoter DNS-szekvenciájának egy módosított változatát tartalmazza. Egy ilyen kiviteli módot szemléltetünk egy „szintetikus” vacciniavírus promoter, például az 5. és 6. példában ismertetett S3A és S4 promoter alkalmazásával.

Az eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomiális szerkesztésének találmány szerinti módszere magában foglalja továbbá a módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekula bevezetését egy első gazdasejtbe, amely a módosított DNS-molekulát fertőző, módosított citoplazmatikus DNS-vírus-virionokba csomagolja. A módosított DNS-molekulát az első gazdasejtbe az első gazdasejt DNS-molekulával való transzfekciójára alkalmas módszerekkel vezetjük be, például olyan módszerekkel, amelyek a szakirodalomból más DNS-ek hasonló gazdasejtekbe való transzfektilására ismertek. Így például egy előnyös kiviteli mód szerint a módosított DNS-t az első gazdasejtbe a Graham és van der Eb szerinti kalcium-foszfátos kicsapós módszerrel visszük be [Virology 52, 456–467 (1973)].

Egy előnyös kiviteli mód szerint a módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus előállítására szolgáló eljárás magában foglalja továbbá az első gazdasejt fertőzését egy második citoplazmatikus DNS-vírusal, amely egy olyan második citoplazmatikus DNS-vírus-genomot tartalmaz, amely úgy expresszálódik, hogy a

módosított DNS-molekulát fertőző, módosított citoplazmatikus DNS-vírus-irionokba pakolja. Az első gazdasejt második vírussal való fertőzésére szolgáló eljárásban a rekombináns DNS-molekula bevezetését az első gazdasejtbe előnyösen mintegy 1 órával az első gazdasejt második vírussal való fertőzése után hajtjuk végre.

Az előbbi módszer egy másik kiviteli módja szerint a szükséges pakolófunkciókat az első gazdasejtben egy, a második vírus teljes genomjától eltérő genetikai elem szolgáltatja, például egy plazmid vagy egy másik expressziós vektor, amely alkalmas az első gazdasejt transzformálására és a kívánt helpervírus-funkciók expresszáására. A helperfunkciók biztosítására egy nem virális genetikai elem alkalmazása lehetővé teszi genetikusan stabil helpersejtek előállítását, amelyek nem termelnek fertőző helpervírusokat. A módosított DNS-molekula pakolására első gazdasejtként ilyen helpersejtek alkalmazása előnyösen csak ezt a módosított DNS-t tartalmazó irionokat termel.

Az első gazdasejt második vírussal való fertőzést magában foglaló eljárásban a második vírust úgy választjuk meg, hogy a második virális genom expressziója az első gazdasejtben a módosított virális genomot tartalmazó fertőző irionokba pakolja a módosított DNS-molekulát. A találmány értelmében lehetségessé válik egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus-genomot tartalmazó módosított DNS intracelluláris pakolása egy rokon vírussal fertőzött sejtekbe való transzfektálással. Így például egy első poxvírusfajból származó DNS-t egy ugyanazon vagy más fajból származó, de ugyanazon poxvírus alcsaládba tartozó második poxvírussal fertőzött gazdasejt pakolja be.

Bizonyos kiviteli módok szerint a második virális genom expressziója az első gazdasejtben a második virális genomot, valamint a módosított virális genomot tartalmazó fertőző irionokat termel. Ez a helyzet például egy bizonyos fajba tartozó első poxvírus-DNS-ek egy ugyanazon fajba tartozó második poxvírussal való homológ pakolása esetében. Noha a transzfektált DNS elméletileg közvetlenül, azaz a transzfektált genom transzkripciója nélkül is pakolható, a transzfektált DNS-molekula homológ pakolásával jár valószínűleg mind a transzfektált DNS, mind a helpervírus DNS-ének replikációja és transzkripciója. Ezt a helyzetet szemléltetjük többek között az 1. és 2. példában a poxvírus-DNS homológ pakolásával.

Más kiviteli alakokban azonban a második virális genom expressziója az első gazdasejtben nem eredményez második virális genomot tartalmazó fertőző irionokat. Heterológ pakolással járó esetekben például a passzív pakolás egyedül nem tud életképes vírusrészecskéket produkálni a transzfektált DNS-ből. Ilyen esetekben előnyösen egy második (helper-) vírust választunk, amely olyan RNS-polimerázt szolgáltat, amely templátként felismeri a transzfektált DNS-t, és ezáltal a transzkripció iniciálására és végső soron a transzfektált DNS replikálására szolgál. Ezt az esetet egy ortopoxvírus- (vaccinia-) vektor módosított genomjának avipoxvírus (baromfipoxvírus) mint helpervírus általi reaktiválásával példázzuk emlős-, első gazdasejtben, amely-

ben a madárpoxvírus nem képes avipoxvírus-genomot tartalmazó fertőző irionokat termelni (lásd a 3. példát).

Egy heterológ vírus alkalmazása módosított DNS-molekula pakolására – például szárnyas- vagy egérpoxvírus alkalmazása helpervírusként vacciniavírus szerkezetekben – előnyösen minimalizálja a rekombinációs eseményeket a helpervírusgenom és a transzfektált genom között, amelyek egyébként akkor mennek végbe, amikor hasonló vírusok homológ szekvenciái vannak jelen egy sejtben [lásd Fenner és Comben (1958); és Fenner (1959)].

A DNS pakolása céljából helpervírus alkalmazására kidolgozott eljárás bizonyos megvalósítási módjaiban a módosított virális genomot tartalmazó fertőző irionok visszanyerésének lépése abból áll, hogy egy második gazdasejtet az első gazdasejtben termelődött fertőző irionokkal fertőzzük. Előnyösen a második gazdasejtet olyan körülmények között fertőzzük, hogy a második virális genom expressziója a második gazdasejtben nem eredményez második vírusgenomot tartalmazó fertőző irionokat. Más szavakkal a második gazdasejtet olyan körülmények között fertőzzük, amely alkalmas a módosított vírus replikációjának szelektálására a helpervírusával szemben. Az eljárást azzal az eljárással szemléltetjük, amelyben a módosított genom egy módosított vacciniavírus-genom, és a második genom egy szárnyaspoxvírus-genom, és a második gazdasejt egy emlőssejt. Ebben az eljárásban a módosított vírust az emlősgazdasejt-tenyésztetben plaktisztítjuk, amelyben a szárnyaspoxvírus nem képez fertőző irionokat (lásd a 3. példát).

Egy másik megvalósítási mód szerint, amelyben a második gazdasejtet olyan körülmények között fertőzzük, amely módosított vírust szelektál, a módosított vírusgenom egy olyan funkcionális gazdaspecifikus gént tartalmaz, amely a második gazdasejtben fertőző irionok termeléséhez szükséges. A második virális genomból hiányzik ez a funkcionális gazdaspecifikus gén. Ezt a megvalósítási módot azzal az eljárással szemléltetjük, amelyben a módosított virális genom egy módosított vacciniavírus-genom, amely a második gazdasejtként alkalmazott humán (MRC 5) sejtekben fertőző vacciniavírus termeléséhez szükséges funkcionális gazdaspecifikus gént tartalmaz (lásd a 8. példát).

Egy másik megvalósítási mód szerint – amely egy második gazdasejtben módosított vírust való szelektálással jár – a módosított virális genom egy szelektív markergént tartalmaz, amely a második virális genomból hiányzik, és a második gazdasejt fertőzésének lépését olyan körülmények között végezzük, amely a szelektív markergént expresszáló vírusgenomra szelektál. Így például a szelektív markergén expressziója a második gazdasejtben a sejteknek rezisztenciát biztosíthat egy citotoxikus hatóanyaggal szemben. A hatóanyag a második gazdasejt fertőzése során olyan koncentrációban van jelen, amely elegendő a szelektív markergént expresszáló virális genomra való szelektáláshoz. Ezt a megoldást azzal az eljárással szemléltetjük, amelynek során az *E. coli* gpt-gént inzertáljuk egy vacciniavírus-ge-

nomba (lásd például az 1. példát), vagy egy szárnyas-poxvírus-genomba (lásd például a 2. példát), mindkét esetben szelektív markergént nem tartalmazó homológ helpervírus alkalmazásával.

Egy másik kiviteli mód szerint a módosított vírus szelekciójára egy második gazdasejtben, a módosított vírusgenom a második virális genomban jelen lévő szelektív markergén delécióját tartalmazza. Ebben az esetben a második gazdasejt fertőzését olyan körülmények között végezzük, amely a szelektív markergént expresszáló vírus genommal szemben szelektál. Így például egy poxvírus timidin-kináz (tk)-gén expressziója a második gazdasejtben (azaz egy timidin-kináz negatív gazdasejtben) a második (helper-) vírust érzékennyé teszi a metabolikus inhibitor 5-bróm-dezoxi-uridinnal szemben. A 4. példában leírjuk ezeknek az inhibitoroknak az alkalmazását a második gazdasejt fertőzése során olyan vacciniavírus-vektorokra (vdTK) való szelektálásra, amelyekből a tk-gén törölve van, és egy többszörös klónozóhellyel van helyettesítve.

A találmány ezenkívül vonatkozik egy módosított virális genomot tartalmazó eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusra is. A találmány szerinti citoplazmatikus DNS-vírus módosított genomja elhatárolható DNS-szekvenciákat tartalmaz, amelyek például szokásos nukleinsavhibridizációval vagy DNS-szekvenáló módszerekkel különböztethetők meg egymástól.

Bizonyos kiviteli alakok szerint például a módosított virális genom egy első eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus első genomját tartalmazza. Ez az első genom egy szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz, amely az egyetlen ilyen hely ebben az első genomban. Ebben a kiviteli alakban a módosított genom szekvenciái, amelyek az első virális genomot tartalmazzák, homológok egy természetben előforduló eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjával. Ezenkívül az első vírus szekvenciájába egy fent megadott érdekes DNS-szekvencia van beépítve.

Annak meghatározására, hogy ez a szekvencia az első virális genomban lévő egyetlen hasítási helyre van-e inzertálva, amint az ezen módosított virális genom kiviteli alakjánál szükséges, összehasonlítjuk az inzertet közvetlenül határoló szekvenciákat a szekvenciaspecifikus endonukleázok hasítási helyeinek szekvenciáival.

A fenti kiviteli alak egyik változata szerint – amelyben a DNS-szekvenciát egyetlen hasítási helyen inzertáljuk az első virális genomba – az első virális genomba inzertált szekvenciát két azonos, érintetlen szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási hely határolja, és a teljes módosított genomban e nukleáz számára csak ez a két hasítási hely áll rendelkezésre. Mindkét fenti hasítási hely az első virális genomból származó hasított helyen és az inzertált DNS-szekvencia kombinált részeiből áll.

Közelebbről a valamely szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmazó kettős szálú DNS mindkét szála úgy tekinthető, hogy egy teljes hasítási hely-szekvenciát ( $S_L S_R$ ) foglal magában, amely egy bal oldali hasítási hely-szekvenciából ( $S_L$ ) és egy jobb

oldali hasítási hely-szekvenciából ( $S_R$ ) tevődik össze, amelyeket egy monofoszfátkötés választ el egymástól, és ezt hasítja szét a megfelelő nukleáz a hasításkor. A fenti kiviteli alak bizonyos megvalósítási formáiban egy DNS-szekvencia inzertálása az egyetlen restriktációs helyre az inzertet határoló két teljes hasítási helyet hoz létre.

A fenti kiviteli alak bizonyos megvalósítási formáiban azonban a DNS-szekvencia inzertálása az egyetlen hasítási helyre nem az eredeti hasítási helyet hozza létre az inzertált DNS-szekvencia mindkét végén (lásd például a 6. példában az egy hasítási hely eliminálásának módszerét). Így az inzertált DNS-t az egyik végén (például a bal oldali végén) egy teljes hasítási hely ( $S_L S_R$ ) határolhatja, míg a jobb oldali végén egy olyan szekvenciában végződik, amely eltér az első virális genomban lévő  $S_R$  szekvenciához közvetlenül kapcsolódó  $S_L$  szekvenciától. Még általánosabban, egy találmány szerinti módosított virális genomban az első virális genom egyetlen helyére inzertált DNS-szekvenciát egy hasítási hely két összeálló része ( $S_L$  és  $S_R$ ) határolja, amely az inzertált DNS-en kívül nem fordul elő a módosított virális genomban.

Egy másik kiviteli alak szerint a módosított virális genom egy DNS-szekvenciát tartalmaz, amely két egyetlen hasítási hely közé van inzertálva az első virális genomban. Ebben az esetben ha az első virális genom egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusban természetesen előforduló genom, az inzertet olyan virális szekvenciák fogják tartalmazni, amelyeket az idegen DNS-szekvenciától legalább a két különböző eredeti hasítási hely felismerhető  $S_L$  és  $S_R$  részei választják el.

Egy további kiviteli alak szerint a módosított virális genom egy egyetlen hasítási helyet tartalmaz egy olyan DNS-szekvenciában lokalizálva, amely egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjában a természetben nem fordul elő. Ebben az esetben ezt az idegen DNS-t nem választják el a természetes virális szekvenciától a hasítási helyek felismerhető  $S_L$  és  $S_R$  részei. A fenti kiviteli alak bizonyos formáiban az első idegen DNS-szekvenciát egy második idegen DNS-szekvencia szakítja meg az első szekvenciában egy egyetlen hasítási helyre inzertálva, vagy az első szekvenciában két ilyen hely közé inzertálva. Ezekben a kiviteli alakokban a második idegen DNS-t az első idegen DNS-szekvenciáktól szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyek felismerhető  $S_L$  és  $S_R$  részei választják el. Ebben az esetben ezt a második idegen DNS-szekvenciát körülvevő minden szekvencia tartalmazza a találmány szerint az első vírus genomját.

A találmány szerinti módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusok előnyös kiviteli alakjai magukban foglalnak egy első fő kiviteli alakot, amiben a módosított virális genom tartalmazza (i) egy első eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus első genomját, amely egy szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz. Ez a hely az egyetlen ilyen hely ebben az első virális genomban. A fenti módosított virális genom tartalmaz ezenkívül (ii) egy első érdekes DNS-szekvenciát is. Ez a DNS-szekvencia az első citoplazmatikus

DNS-vírus-genom egyetlen hasítási helyére van inzertálva.

A módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus első kiviteli alakjának egyik variációjában az egyetlen hasítási helyet tartalmazó első virális genom egy természetben előforduló virális genom. Ezt a változatot egy olyan módosított poxvírusgenommal szemléltetjük, amely egy természetben előforduló vacciniavírus-genomot tartalmaz, amelyben az NotI és SmaI bakteriális restrikciós endonukleázok számára van egyetlen hasítási hely (lásd az 1. és a 3. példát). Ebben a kiviteli alakban az első DNS-szekvencia, amely az egyetlen hasítási helyre van inzertálva, egy természetben előforduló vacciniavírus promotor által szabályozott *E. coli* gpt-gén, amely egy vacciniavírus-genom NotI helyére (1. példa) vagy SmaI helyére (3. példa) van inzertálva.

A módosított vírus első kiviteli alakjának egy másik változatban az egyetlen hasítási helyet tartalmazó első virális genom egy olyan második DNS-szekvenciát is magában foglal, amely virális genomban a természetben nem fordul elő. Ezenkívül ez a második DNS-szekvencia tartalmazza az első DNS-szekvencia inzertálására az egyetlen hasítási helyet. Ezt a változatot egy olyan módosított szárnyaspoxvírus-genommal példázzuk, amely egy *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz-gént kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz (2. példa). Ez a bakteriális gén a bakteriális restrikciós NotI endonukleáz hasítási helyét foglalja magában, amely az egyetlen ilyen hely a módosított szárnyaspoxvírus-genomban, és ezért különösen alkalmas idegen DNS-szekvenciák inzertálására.

A találmány szerinti módosított vírus első kiviteli alakjának másik változata szerint az egyetlen hasítási helyre inzertált első DNS-szekvenciának legalább egy része egy promotor transzkripció szabályozása alatt áll. Bizonyos esetekben a promotor az első virális genomba inzertált első DNS-szekvenciában lokalizálódik. Ez az eset például, ha az inzertált DNS egy promotert és egy funkcionálisan kötött gént tartalmazó génkettőt foglal magában, lásd például többek között az 1. és a 2. példát.

A találmány szerinti módosított citoplazmatikus DNS-vírus második kiviteli alakja szerint a módosított virális genom tartalmaz (i) egy első és egy második hasítási helyet szekvenciaspecifikus endonukleázok számára egy első virális genomban, ahol a fenti helyek mindegyike az egyetlen ilyen ebben az első vírusgenomban. A fenti kiviteli alak egyik előnyös variációja szerint az első virális genom egy több egyedi hasítási helyet tartalmazó többszörös klónozóhelyet foglal magában.

A fenti második kiviteli alakban a módosított virális genom tartalmaz még (ii) egy első DNS-szekvenciát is, amely eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusban a természetben nem fordul elő, és ez az első DNS-szekvencia az első és második egyetlen hasítási hely közé van inzertálva az első virális genomban.

A találmány szerinti módosított citoplazmatikus DNS-vírusok harmadik kiviteli alakja egy olyan módosított virális genom, amely tartalmaz (i) egy eukarióta

citoplazmatikus DNS-vírusok genomjában természetes körülmények között nem előforduló első DNS-szekvenciát tartalmazó első virális genomot. Ez az első DNS-szekvencia egy szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz, amely az egyetlen ilyen hely a módosított virális genomban. A fenti kiviteli alakban a módosított virális genom tartalmaz továbbá (ii) egy promotert, amely úgy helyezkedik el, hogy az egyetlen hasítási helyre inzertált DNS-szekvencia a promotor transzkripció szabályozása alatt áll. Ez az első DNS-szekvencia nem tartalmaz transzlációs startkodont a promotor és a DNS-szekvencia inzertálására alkalmazott egyetlen hely között. Ezt a kiviteli alakot a 6. példában ismertetett vS4 vacciniavírus-vektorral szemléltetjük, amely egy szintetikus poxvírus promotert tartalmaz úgy lokalizálva, hogy ez a promotor szabályozza a nyílt leolvasási keretek inzertálására tervezett többszörös klónozóhelyre inzertált DNS-szekvencia transzkripcióját.

A találmány vonatkozik továbbá olyan DNS-molekulára is, amely egy találmány szerinti módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus módosított genomját tartalmazza. Egy előnyös kiviteli alak szerint ezt a DNS-molekulát genomialis DNS-molekulák extrahálásával állítjuk elő a találmány szerinti módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus virionjaiból vagy a találmány szerinti módosított vírussal fertőzött sejtekből. A módosított virális genomialis DNS-ek virionokból való extrahálására alkalmas módszerek a szakirodalomból ismertek. Ezenkívül az eukarióta citoplazmatikus DNS-vírusok DNS-einek előállítására alkalmas módszereket az 1. példában is ismertetünk.

A találmány vonatkozik továbbá a találmány szerinti eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomialis DNS-karjaira is. Ezek a genomialis DNS-karok idegen DNS-eket tartalmazó virális genomok közvetlen molekuláris klónozására alkalmasak. Közelebbről az előző vonatkozásban a találmány két DNS-molekulára vonatkozik, egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus módosított virális genomjának bal és jobb genomialis karjára. A találmány szerinti közvetlen klónozási módszer gyakorlati megvalósításában a fenti karok egyike vagy mindkettő teljes egészében olyan DNS-szekvenciából állhat, amely citoplazmatikus DNS-vírusban természetes körülmények között előfordul. A találmány szerinti fenti megoldás értelmében az új DNS-molekula azonban egy virális genomnak egy módosított karja, más szavakkal egy DNS-molekula, amely egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus módosított virális genomjának egyik végét tartalmazza. A módosított virális genom ezen vége egy érdekes DNS-szekvenciát foglal magában, amely ezt a DNS-molekulát megkülönbözteti azoktól a genomialis karoktól, amelyek csak egy citoplazmatikus DNS-vírusban természetes körülmények között előforduló szekvenciát foglalnak magukban. Ezenkívül a módosított virális genom, amelyből az új kar származik, tartalmaz egy szekvenciaspecifikus endonukleáz számára egy egyetlen hasítási helyet is. Ezenkívül ez a DNS-molekula olyan terminálissal rendelkezik, amely homológ a módosított virális genom-

ban lévő egyetlen hasítási hely szekvenciaspecifikus endonukleázzal való hasításával kapott termékkel.

Egy előnyös kiviteli alak szerint ezt a genomiális kart tartalmazó DNS-molekulát úgy állítjuk elő, hogy egy módosított vírus genomiális DNS-et egy szekvenciaspecifikus endonukleázzal az egyetlen hasítási helyen hasítjuk. Ezt a DNS-molekulát úgy is előállíthatjuk, hogy egy másik DNS-molekulát módosítunk, és ezáltal egy olyan terminálist alakítunk ki, amely homológ a módosított virális genomban lévő egyetlen hasítási helyen való hasítással kapott terminálissal. Például egy találmány szerinti fenti DNS-molekulát egy természetben előforduló genomiális virális DNS egyik karjából állíthatunk elő. Egy ilyen természetben előforduló virális karból a kívánt DNS-molekulát például egy szintetikus adapter DNS-szegmenshez való ligálással állíthatjuk elő, amely egy olyan hasítási helyből származó ragadós véget tartalmaz, amely az első virális genomban nincsen jelen. Ebben az esetben az első virális genom vége és a ligált adapter együtt tartalmazzák egy módosított virális genom egyik végét. Ennek megfelelően ez a bizonyos DNS-molekula – noha nem egy módosított virális genomiális DNS hasításával állítjuk elő, mégis tartalmaz egy olyan terminálist, amely homológ azzal a terminálissal, amely egy módosított virális genom egyetlen hasítási helyén való hasítással keletkezik.

A találmány szerinti módosított virális DNS-kar egy másik kiviteli alakja szerint az egy eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus genomjában természetes körülmények között nem előforduló DNS-szekvencia tartalmaz egy szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet, amely egyetlen ilyen hely a módosított virális genomban. Ez a hasítási hely tartalmaz továbbá egy bal oldali hasításihely-szekvenciát ( $S_L$ ) a bal genomiális DNS-kar számára vagy egy jobb oldali hasításihely-szekvenciát ( $S_R$ ) a jobb genomiális DNS-kar számára, amely teljes hasításihely-szekvenciaként ( $S_L$ ,  $S_R$ ) jelenik meg, és ez az egyetlen ebben a módosított virális genomban. Ezt a kiviteli alakot többek között szárnyas-poxvírus-vektorból NotI bakteriális restrikciós endonukleázzal előállított DNS-karokkal példázzuk (lásd a 2. példát) vagy vS4 vacciniavírus-vektor karjaival, amelyeket egy inzertált többszörös klónozóhely bármely egyedi hasítási helyén való hasítással állítottunk elő (például a 6. példa).

A találmány vonatkozik továbbá egy készletre is, amely eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus módosított virális genomjának közvetlen molekuláris klónozására alkalmas. Ez a készlet (i) találmány szerinti tisztított DNS-molekulákat tartalmaz. Ezek a DNS-molekulák vagy a találmány szerinti genomiális virális DNS-karokat tartalmazzák, vagy egy találmány szerinti teljes, intakt módosított virális genomot, vagy mind a kettőt. A virális DNS-karok a klónozendő idegen DNS-szegmensek közvetlen ligálására alkalmasak, míg az érintetlen virális DNS-ek egy szekvenciaspecifikus endonukleázzal való hasítás utáni klónozásra alkalmazhatók, amely hasítást a módosított virális genomban az egyetlen ilyen helyen végezzük.

A találmány szerinti készlet tartalmaz továbbá (ii) egy DNS-ligázt és (iii) oldatokat és egyéb reagenseket a DNS-szegmensek egymással való ligálására az előbbi módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekula előállítására. A ligálásra alkalmas puffert és reagenseket például az 1. példában ismertetjük.

Egy kiviteli alak szerint ez a készlet tartalmaz továbbá egy génexpressziós kazettát tartalmazó plazmidot, amely kazettát szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyek határolják. A megfelelő szekvenciaspecifikus endonukleázzal való hasításkor a kazettát határoló helyekből olyan végek keletkeznek, amelyek alkalmasak a fenti kazetta inzertálására a DNS-molekula által kódolt módosított virális genom egyetlen hasítási helyére.

Egy másik kiviteli alak szerint ez a klónozókészlet tartalmaz továbbá egy első gazdasejtet és egy második (helper-) vírust, amely alkalmas a módosított virális genom fertőző virionokba való pakolására.

A találmány vonatkozik továbbá plazmidokra is, amelyek különösen alkalmasak köztermékként a találmány szerinti módosított citoplazmatikus DNS-vírusvektorok megszerkesztésére. A találmány előbbi kiviteli alakja szerint egy olyan plazmidot jelent, amely egy, mind a két végén ugyanazt a szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmazó DNS-szegmenst foglalja magában. Ez a hely egyúttal az egyetlen ilyen hely egy találmány szerinti első citoplazmatikus DNS-vírusgenomban is. Ez a DNS-szegmens több, egymással szoros szomszédságban lévő szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmazó többszörös klónozóhelyet is magában foglal, amely hasítási helyek a plazmidban egyetlenek, és ezért alkalmasak idegen DNS-szegmensek inzertálására a plazmidba.

Ez a plazmid alkalmas gének inzertálására a DNS-szegmens egyetlen hasítási helyére és szegmens ezt követő bevitelére egy citoplazmatikus DNS-vírus egyetlen hasítási helyére, a találmány szerinti közvetlen molekuláris klónozó módszer alkalmazásával. Ezt a plazmidot a pN2 plazmiddal szemléltetjük (lásd az 1. példát, az 1.3 ábrát), amely NotI helyekkel határolt többszörös klónozóhelyet tartalmazó DNS-szegmensekkel rendelkezik, és az alábbi további bakteriális restrikciós enzim hasítási helyeket tartalmazza a megadott sorrendben: XbaI, SpeI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII és ClaI.

Egy találmány szerinti másik plazmid egy olyan DNS-szegmenst tartalmaz, amely mindkét végén olyan hasítási hellyel rendelkezik, amely az egyetlen ilyen hely egy citoplazmatikus DNS-vírusban. Ennek a plazmidnak a DNS-szegmense tartalmaz továbbá számos olyan restrikciós enzim hasítási helyet, amely a plazmidban egyedi. Ez a DNS-szegmens tartalmaz továbbá egy szelektív markergént (például egy *E. coli* gpt-gént), egy citoplazmatikus DNS-vírus promoter (például a vacciniavírus P7,5 promoter) transzkripció szabályozása alatt. Ezt a plazmidot a pN2–gpta és pN2–gptb plazmidokkal szemléltetjük, amelyek NotI helyekkel határolt DNS-szegmenst tartalmaznak, és magukban foglalják az *E. coli* gpt-gént is egy vacciniavírus P7,5 promoter

transzkripció szabályozása alatt. Ezt a plazmidot úgy állítottuk elő, hogy a pN2 plazmid SmaI hasítási helyére inzeráltuk a promoter génkasszétát, amint azt az 1.3 ábrával kapcsolatban ismertetjük.

A fenti plazmid egy módosított formája szerint a DNS-szegmens tartalmaz továbbá egy második poxvírus promotert is, működőképesen kötve egy restrikciós endonukleáz hasítási helyet tartalmazó DNS-szekvenciához. Ez a plazmid – amelyet a pN2gpt–S3A plazmiddal szemléltetünk (4.7 ábra) – alkalmazható olyan nyílt leolvasási keretek inzerálására, amelyekben nincsen saját iniciációs kodon egy vacciniavírus-vektorba való transzferhez. Hasonlóképpen a pN2gpt–S4 plazmid (4.7 ábra) alkalmazható egy AUG translációs startkodont is tartalmazó teljes nyílt leolvasási keretek inzerálására.

Egy másik kiviteli alak szerint ez a plazmid tartalmaz továbbá egy humán plazminogént kódoló DNS-szekvenciát, amelyben a DNS-szekvencia működőképesen van kötve a poxvírus promoterhez és startkodonhoz. Ezt a plazmidot a humán glu-plazminogént kódoló pN2gpt–GPg plazmiddal és a lys-plazminogént kódoló pN2gpt–LPg plazmiddal szemléltetjük, amelyből a humán plazminogén 1–77. aminosavját kódoló régió törölve van (5.2 és 5.3 ábra).

Egy hasonló kiviteli alak szerint ez a plazmid tartalmaz továbbá egy humán immunhiányvírus (HIV) gp160-at kódoló DNS-szekvenciát, amelyben a DNS-szekvencia működőképesen van kötve a poxvírus promoterhez és startkodonhoz. Ezt a pN2gpt–gp160 plazmiddal szemléltetjük, amely a szintetikus S4 vacciniavírus promoter által szabályozott gp160 gént tartalmazza (5.4 ábra).

Egy újabb találmány szerinti plazmid egy citoplazmatikus DNS-vírus-genom szegmenst tartalmaz, amelyben a virális timidin-kináz (tk)-gén lokalizálódik. Ebben a plazmidban a tk-gént kódoló régiót módosítottuk (töröltük), az aktív tk enzim expressziójának meggátolására. Ezt a plazmidot köztiterméként alkalmazhatjuk egy tk-gén hiányos citoplazmatikus DNS-vírus-vektor szerkesztésére a hagyományos marker rescue-módszerek alkalmazásával, amint azt a vacciniavírus tk-gén esetében leírtuk pHindJ–3 plazmidot alkalmazva. Egy hasonló kiviteli alak szerint egy citoplazmatikus DNS-vírus valamely módosított tk-gén régióját tartalmazó plazmid tartalmaz továbbá egy többszörös klónozóhelyet, amely számos olyan szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz szoros szomszédságban, amelyekből a plazmidban csak egy-egy van jelen. Ezenkívül a fenti helyek mindegyike hiányzik abból a citoplazmatikus DNS-vírusból, amelybe a módosított tk-gén régiót inzerálni kívánjuk. Ezért a fenti egyes helyeket tartalmazó módosított tk-gén régió virális genomba való inzerálása után ezek a helyek alkalmasak idegen DNS-szegmensek találmány szerinti közvetlen klónozási módszerrel való inzerálására a módosított tk-gén régiót tartalmazó citoplazmatikus DNS-vírus-genomba.

Ezt a többszörös klónozóhelyet tartalmazó módosított tk-gén-tartalmú plazmidot a pHindJ–3 plazmiddal

szemléltetjük, amelyben a pHindJ–2 plazmid módosított vacciniavírus tk-gén régiójába inzeráltunk egy többszörös klónozóhelyet, amely az NotI, SmaI, ApaI és RsrII egyedi helyeket tartalmazza az SfiI helyek által határolva (4.2 ábra). A vacciniavírus-vektorba való kényszerített klónozás további elősegítésére kihasználva az SfiI felismerőszekvenciák variálhatóságát a két SfiI hely közül mind a kettő egyetlen a vektorban, amint azt a 4. példában részletesen ismertetjük.

Egy további kiviteli alakban egy plazmid olyan szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyet tartalmaz, amely a vírus genomjában egyetlen. Az ilyen plazmidok különösen alkalmasak génexpressziós kazetták szerkesztésére a fenti egyetlen helyet tartalmazó vektorokba való transzferhez. A pAO plazmiddal szemléltetjük azt az alapplazmidot, amely a vdTK vacciniavírus-vektor mester-klónozóhelyének egyetlen helyeit tartalmazó mester-klónozóhelyet tartalmaz (4.3 ábra). Két hasonló, pA1 és pA2 plazmidot terveztünk DNS-szegmensek, például szintetikus vagy természetes promoter fragmensek inzerálására, és ezeket úgy szerkesztettük meg, hogy a pAO vektor XhoI helyére inzeráltunk egy linkert, amely olyan gyakori hasító enzimek második többszörös klónozóhelyét tartalmazza, amelyek nem hasítják a pAO-t. Mind a két plazmid azonos szerkezettel rendelkezik, kivéve a második többszörös klónozóhely orientációját (4.3 ábra).

Egy másik kiviteli alakban a plazmid egy poxvírus promotert tartalmaz működőképesen kötve egy translációs startkodonhoz, mimellett ezt a startkodont közvetlenül követi egy második restrikciós endonukleáz hasítási hely olyan megfelelő elrendezésben, hogy lehetővé tegye a második restrikciós endonukleáz hasítási helyre inzerált nyílt leolvasási keret translációját. Ezt a plazmidot a pA1–S1 és pA2–S1 plazmidokkal szemléltetjük, amelyek egy translációs startkodont is tartalmazó erős S1 szintetikus poxvírus promotert tartalmaznak, ezt egy egyetlen EcoRI hely követi, amely alkalmas olyan nyílt leolvasási keretek inzerálására, amelyekben nincs kapcsolódó startkodon (4.4 ábra). A pA1–S2 és pA2–S2 plazmidok hasonlóak a pA1–S1 és a pA2–S1 plazmidhoz, de egy eltérő, S2 poxvírus promotert tartalmaznak (4.5 ábra).

Egy hasonló kiviteli alakban a fenti plazmid tartalmaz továbbá egy humán protrombint kódoló DNS-szekvenciát, és a fenti DNS-szekvencia működőképesen van kötve a fenti poxvírus promoterhez és a fenti startkodonhoz. Ezt a plazmidot a pA1S1–PT plazmiddal szemléltetjük (5.1 ábra), amelyben egy módosított protrombin cDNS-t inzeráltunk a pA1–S1 plazmid egyetlen EcoRI helyére.

Egy másik találmány szerinti plazmid a vacciniavírus DNS módosított EcoRI K fragmensét tartalmazza, amelyből a K1L gazdaspecifikus gént töröltük. A vdhr helpervírust, amelyből mind a K1L, mind a C7L gazdaspecifikus gén hiányzik, a C7L-negatív WR–6/2 törzsből szerkesztettük, marker rescue-módszerrel, egy módosított EcoRI K fragmens alkalmazásával, amelyből a K1L gazdaspecifikus gént töröltük (lásd 8.1 ábrát). Ez a módosított EcoRI K fragmens egy

szelektív markergént (*E. coli* gpt-gént) tartalmaz, a módosított EcoRI K fragmenst tartalmazó rekombináns WR-6/2 genomok szelektálásának megkönnyítésére, intracelluláris marker rescue-módszert alkalmazva Sam és Dumbell módszere szerint (1981). A példászerűen bemutatott plazmidot pEcoK-dhr plazmidnak nevezzük (8.1 ábra).

Egy további lépésben a pEcoK-dhr-t NotI-gyel linearizáljuk, és a pN2-gpta plazmidból (4. példa) NotI-gyel való emésztéssel kapott 1,1 kb P7,5 gpt-gén-kazettával ligáljuk. A kapott pdhr-gpt plazmidot (8.1 ábra) alkalmazzuk a marker rescue-kísérletekben a vdhr helper-vírus előállítására Sam és Dumbell marker rescue-módszere szerint (1981).

A találmányt az alábbiakban kiviteli példákkal szemléltetjük. Az alábbi példákban bizonyos termékeket táblázatosan megadott adataik segítségével jellemzünk. Ezekben a táblázatokban az alábbi rövidítéseket alkalmazzuk:

CDS=kódolószekvencia

rc=reverz komplementer szekvencia

rcCDS= reverz komplementer kódolószekvencia, az arab számok a nukleotidok helyzetét jelölik

ATG=transzlációs startkodon

EMBL ID=azonosító az EMBL adatbankban.

#### 1. példa

*Szelektív markergént (*E. coli* gpt-gént) tartalmazó idegen DNS közvetlen molekuláris klónozása egy ortopoxvírus (vaccinia) genomjában lévő egyetlen (NotI) hasítási helyre*

Ebben a példában szemléltetjük egy génexpressziós kazetta közvetlen molekuláris klónozását egy pox-vírusgenomba a találmány szerinti eljárással, egy génszintetileg módosított poxvírus-DNS intracelluláris pakolásával. Ezenkívül ez a példa illusztrálja az inzerált szelektív markergént tartalmazó módosított vacciniavírusok hatékony visszanyerésére szolgáló genetikai szelekciós eljárás alkalmazását. A kísérleti eredmények nyilvánvalóvá teszik azt is, hogy a rekombináció gyakran létrejön a pakolandó DNS és a fertőző helpervírus között a pakolás során, ha a helpervírus DNS-e homológ a pakolandó DNS-sel.

Közelebbről az alább ismertetett első közvetlen molekuláris klónozkísérlet azt mutatja, hogy egy markergén (gpt-gén) kazetta NotI restrikciós fragmensként inzerálható egy NotI-gyel hasított vacciniavírus DNS-be, és ezután vacciniavírus-sal fertőzött emlőssejtekben pakolható. A 9 vizsgált plakk közül 1 tartalmazott olyan vírust, amely a várt szerkezettel rendelkezett, mégpedig egy gpt-gén egyetlen inszerciójával „a” orientációban (lásd az 1.11 ábrát). A fenti, vp7-nek nevezett klón szerkezete stabil volt a nagy léptékű replikáció során, szelekciós szer távollétében.

A második klónozási kísérleti szériában 12 vizsgált klón közül 7 rendelkezett a várt szerkezettel. Ebbe a sorozatba tartozott azonban 4 kicsi (E1-E4), lassan replikálódó vírusplakk is, noha ezek előnyösen normális módon nem szelektálódnak a találmány szerinti eljárással. A szelektálási körülmények között olyan rekombi-

násokat is kaptunk, amelyek a szelektív markergént több inzerben tartalmazták. Az előbbi többszörös inzeret tartalmazó rekombinánsok stabilitását nem vizsgáltuk szelekciós szer távollétében, amelyről tudott, hogy az egyébként nem stabil szerkezeteket stabilizálja [lásd Falkner és Moss, J. Virol. 64, 3108-3111 (1990)].

A várt szerkezetek viszonylag alacsony hozama meglepő volt, tekintettel a DNS-molekulák helyspecifikus hasítására és ligálására alkalmazott génszintetikus módszerek ismert precizitására. Azonban az előbbi modellrendszerben az inzerálásra kiválasztott szekvencia, a gpt-gén-kazetta a P7,5 promotor vacciniavírus DNS-szekvenciáit tartalmazza, amelyek homológok két endogén vacciniavektor promoterral, amelyek a vacciniagenom invertált terminális ismétlődéseiben lokalizált két vacciniavírus 7,5 kD polipeptidgént szabályozzák [lásd Venkatesan, B., Baroudy B. M. és Moss B., Cell 25, 805-813 (1981)]. Ezt a P7,5 promotert alkalmazták vacciniavírus rekombinánsok szerkesztésére hagyományos intracelluláris rekombinációval, és stabilan integrálható vaccinia timidin-kináz génbe [Mackett és Smith (1986)]. Esetenként azonban a DNS-fragmensek szubmoláris mennyiségei megjelennek a hagyományos rekombinánsok analízise során, ezek másodlagos rekombinációs eseményekből származhatnak. Ha a P7,5 promotert az endogén P7,5 promoterek közelébe (azaz néhány kilobázison belül) inzeráljuk, csak azok a rekombinánsok stabilak, amelyek egy invertált ismétlődő szerkezettel rendelkeznek, ezt a megfigyelést használták ki egy deléciós eljárás kifejlesztésére, amely egy tandem-szerűen ismétlődő P7,5 promotor szegmens inzerálásán alapul [Spehner, D., Drillien, R. és Lecocq, J. P., J. Virol. 64, 527-533 (1990)].

A jelen esetben, amikor egy gpt-gén-kazettát inzerálunk a vacciniavírus NotI helyére, a bal invertált terminális ismétlődés és az inzerált kazetta P7,5 promotorai közötti távolság mintegy 30 kb, valószínűleg elég közeli ahhoz, hogy másodlagos destabilizáló rekombinációs eseményeket okozzon. Ténylegesen csak néhány lassan replikálódó instabil klón szerkezete tartalmaz inzeret „b” orientációban, amely az inzerált és az endogén promoterek tandem ismétlődő elrendeződését jelentené. Így ennek a szerkezetnek a ritka előfordulása legvalószínűbben a gpt-gén-kazetta P7,5 promotereinek és az endogén P7,5 promoterek helyének közelségével, és a P7,5 promotor tandem-szerűen ismétlődő kópiáinak ismert instabilitásával magyarázható.

Ezzel szemben a vp7 vírus és néhány más izolátum (A1, A4, C1 és C2) „a” orientációban tartalmaz inzeret, és ezek stabilak. Egy izolátum, a C4 szerkezeti analízise egy fej-láb kettős inzerre utal.

A második klónozási kísérlet-sorozatban (5 különböző mintában) a bepakolt gpt-génre pozitív vírusok titere közelítőleg  $1 \times 10^5$  pfu/ $8 \times 10^6$  sejt, míg az első kísérlet-sorozatban ugyanilyen számú sejtre  $1-2 \times 10^2$  pfu titert kaptunk. A módosított vírusok titerét számos faktor befolyásolja, többek között a ligálás és pakolás hatékonysága, a klónozási eljárásban alkalmazott reakció- és tenyésztési körülmények és az a gondosság, amit arra fordítunk, hogy elkerüljük nagy molekulájú vektor DNS-

nyíródását a kezelés során. Az alábbiakban ismertetett standard körülmények között általában  $10^5$  pfu/ $8 \times 10^6$  sejt körüli titerek várhatók.

Míg a jelen példa azt mutatja, hogy a vacciniavírus egyetlen, génen belüli NotI helye alkalmazható idegen DNS inzertálására, annak szükségességét is bemutatja, hogy meg kell fontolni, hogy egy javasolt inzert tartalmazhat-e olyan típusú virális szekvenciákat és orientációkat, amelyek ismert módon vagy feltehetőleg a módosított vírusok instabilitását okozzák. Stabilitás szempontjából előnyösek azok az inzertek, amelyekben nincs homológia az inszerció helyéhez közeli (például 30 kb-on belüli) virális szekvenciákkal. Ennek megfelelően a csak rövid, a vektor transzkripció rendszerét által felismerhető szintetikus promoter szekvenciákat tartalmazó inzertek előnyösek azokhoz képest, amelyek nagy virális DNS-szegmenseket tartalmaznak, beleértve a virális vektor természetes promotereit is (lásd például az S1 promotert a 4. példában alább).

Az alábbi anyagokat és módszereket alkalmaztuk ebben, és az összes többi példában, kivéve, ha azt másképp adjuk meg.

#### *Ortopoxvírus és DNS tisztítása*

A vacciniavírust [vad típusú Western Reserve (WR) törzs; American Type Culture Collection No. VR 119] két egymást követő szacharóz gradienssel tisztítjuk Mackett és munkatársai módszere szerint [D. M. Glover, DNA Cloning: A practical approach, 191–211 (IRL Press, 1985)]. A vírus DNS-t proteináz K–SDS eljárással állítjuk elő Gross–Bellard és munkatársai módszere szerint [Eur. J. Biochem. 36, 32–38 (1973)].

#### *Izolált poxvírus DNS-módosítása*

A virális DNS-t (rendszerint 2–5  $\mu$ g-ot) megfelelő mennyiségű, egy vagy több szekvenciaspecifikus endonukleázzal (például NotI bakteriális restrikciós endonukleázzal) hasítjuk, adott esetben borjúbél lúgos foszfátázzal (Boehringer, Inc.) kezeljük, és fenolos extrakcióval és etanolos kicsapással tisztítjuk a szokásos rekombináns DNS-módszerek szerint. A kapott virális DNS-karokat 5–50-szeres mólfeleslegben lévő inzertálható DNS-fragmensekkel ligáljuk, amely a virális karral való ligálásra kompatibilis végekkel rendelkezik. A ligációs elegy egy aliquotját lengetett (field inversion) gélelektroforézissel analizáljuk.

Még pontosabban, az alább ismertetett második kísérletsorozatban (A–E) 2  $\mu$ g NotI-gyel emésztett, foszfátázzal nem kezelt vacciniavírus-DNS-t ligálunk 200–600 ng gpt-gén-kazetta inzerttel 30 ml térfogatban, 5–15 egység T4 ligázzal, 12 °C-on, 48 órán keresztül, amint azt az 1. táblázatban összefoglaltuk.

#### *In vivo pakolás emlősejtekben*

$8 \times 10^6$  afrikai zöldmajom (CV–1)-sejtet fertőzünk helpervírus (vagy vaccinia WR vad típusú, vagy WR6/2 vírussal vagy más vírussal, ahogy azt jelezzük) 0,2 pfu/sejt koncentrációban 2 órán keresztül. A virionokból izolált intakt DNS-ekkel való pakolás bizonyítására először 20  $\mu$ g virális (vPgD) DNS-t alkalmaztunk. Az extracellulárisan módosított genomok pakolására 1  $\mu$ g DNS-t alkalmaztunk, amelyet a ligációs reakcióelegyből tisztítottunk. A DNS-eket kalcium-foszfá-

tos precipitációs technikával transzfektáljuk a sejtekbe (Graham F. L. és van der Eb, 1973). A sejteket szobahőmérsékleten 15 percen keresztül inkubáljuk, majd 9 ml tápközeget (DMEM, 10% magzati borjúsérum, glutamin és antibiotikumok) adunk a sejtekhez 1 ml precipitátumra számolva. 4 óra múlva a tápközeget kicseréljük, és az inkubálást 2 napon keresztül tovább folytatjuk.

A nyersvírus törzsszuspenziókat standard eljárásokkal állítjuk elő (Mackett és munkatársai 1985). A plakvizsgálatok és az E. coli gpt-génre való szelekciós körülményei a szakirodalomból ismertek [lásd Falkner és Moss, J. Virol. 62, 1849–1854 (1988); és Boyle és Coupar, Gene 65, 123–128 (1988)].

#### *Lengetett (field inversion) gélelektroforézis (FIGE)*

A virális DNS-t 1%-os agarózgélben választjuk szét Tris/acetát/EDTA-pufferben (40 mmol/l Tris/20 mmol/l jéget/2 mmol/l EDTA, pH 8,0) mikrokomputerrel szabályozott energiaforrással (Consort Model E790). A fragmensek teljes skálájának szétválasztására egymást követően 4 programot futtatunk az alábbiak szerint: 1. program: 5 óra 7 V/cm-en, előre pulzus (F) 6 s, fordított pulzus (R) 3 s, szünet 1 s; 2. program: 5 óra 7 V/cm-en, F 4 s, R 2 s, szünet 1 s; 3. program: 5 óra 7 V/cm-en, F 2 s, R 1 s, szünet 1 s; és 4. program: 5–10 óra 7 V/cm-en, F 8 s, R 4 s, szünet 1 s.

#### *pN2 plazmid szerkesztése*

A Bluescript II SK plazmidot (Stratagene, Inc.) HindII-vel emésztjük, és NotI linkerrel (Pharmacia Inc.) ligáljuk. A kapott pN2 plazmid NotI helyekkel határolt többszörös klónozóhelyet tartalmaz. Közelebről a pN2 többszörös klónozóhelye az alábbi helyeket tartalmazza a megadott sorrendben: NotI, XbaI, SpeI, BamHI, SmaI, PstI, EcoRI, EcoRV, HindIII, ClaI és NotI. A pN2 inzertált NotI linker szekvenciája és a pBluescript II SK (Stratagene, Inc., La Jolla, USA) 5'- és 3'-határoló régióinak 20 bázisa az 1. azonosítási számú szekvenciában látható. Az inzertált szekvencia a 21-es helyzetben kezdődik és a 28-as helyzetben ér véget. (Az első T-maradék az 5'-végen a 2266-os helyzetnek felel meg, az utolsó G-maradék a 3'-végen a 2313-as helyzetnek felel meg a pN2 plazmidban.)

#### *pN2–gpta és pN2–gptb plazmidok szerkesztése*

A P7,5 promoter gpt-génkzettát tartalmazó 1,1 kb HpaI–DraI fragmenst a pTKgpt–F1s plazmidból (Falkner és Moss, 1988) izoláltuk, és a pN2 plazmid SmaI helyére inzertáltuk (1.3 ábra). A kapott plazmidok orientációs izomerek, és ezeket pN2–gpta-nak és pN2–gptb-nek neveztük. A vacciniavírus P7,5 promotor–E. coli gpt-génkzetta és a pN2 5'- és 3'-határoló régióinak 20 bázisa a pN2–gpta esetében a 2. azonosítási számú szekvenciában látható. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és az 1113-as helyzetben ér véget. A gpt-gén transzlációs iniciálókodonjának A-maradéka az 519-es helyzetnek felel meg. A gpt-gén transzlációs stopkodonjának T-maradéka a 975-ös helyzetnek felel meg. (Az 5'-végen az első C-maradék a 2227-es helyzetnek és a 3'-végen az utolsó T-maradék a 3359-es helyzetnek felel meg a pN2–gpta plazmidban.)

A P7,5 vacciniavírus promotor–E. coli gpt-génkazzetta fordított komplementer formája, és a pN2 5'- és 3'-határoló régióinak 20 bázisa a pN2–gptb génre a 3. azonosítási számú szekvenciában látható. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik, és az 1113-as helyzetben ér véget. A CAT translációs iniciálókodon fordított komplementjének T-maradéka a 615-ös helyzetnek felel meg. A gpt-gén translációs stopkondonja fordított komplementjének A-maradéka a 159-es helyzetnek felel meg.

A rekombináns DNS-analízis egyéb szokásos eljárásait (például Southern-blot, PAGE, nick transláció) a J. Sambrook és munkatársai által ismertett módon hajtottuk végre [Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)].

#### Csupasz virális DNS pakolása

A csupasz poxvírus-DNS helpervírus általi pakolására szükséges körülmények megállapítása céljából egy rekombináns vacciniavírus (vPgD) virionjaiból izolált intakt DNS-t transzfektáltunk helpervírral (vad típusú vaccinia WR) fertőzött majom (CV-1) sejtekbe. A kiválasztott rekombináns vírus számos, könnyen felismerhető fenotipikus markert tartalmaz. Így a vPgD genom a virális timidin-kináz (tk) lokuszban egy gyógyszerrezisztencia markert tartalmaz (az E. coli xantinguanin-foszforibozil-transzferáz enzimjét kódoló gént; azaz a gpt-gént) és egy könnyen detektálható markerprotein (humán plazminogén) génjét. Ezt a vírust eredetileg egy vacciniavírus törzsből állították elő [WR 6/2: Moss és munkatársai J. Virol. 40, 387–395 (1960)], amelyben mintegy 9 kb delécio van, és ennek következtében nem expresszálja a Kotwal és munkatársai által ismertett [Nature 335, 176–178 (1988)] virális fő szekretált 35K proteingént. A pakolt vírus várt fenotípusa ezért: tk-negatív (azaz bróm-dezoxi-uridin jelenlétében replikálódik); gpt-pozitív (azaz mikofenolsav és xantin jelenlétében replikálódik); humán plazminogén gént expresszál, és nem expresszálja a szekretált 35K proteint.

Analizáltuk a fenti pakoló kísérletből származó 8 gpt-pozitív plakkot. A plakkok mindegyike tk-negatív volt, és – amint azt az 1.1 ábra mutatja – mind expresszálta a plazminogént. Az izolátumokból 6 (5., 6., 7., 11., 12. és 14. sáv) nem expresszálta a 35K szekretált vacciniaproteint, így a transzfektált genomális DNS összes jellemzőjét mutatta. A plakkok közül kettő a 35K proteinmarkert is expresszálta (4. és 13. sáv), ezért ezek a vad típusú helpervírus (8. és 15. sáv) és a bevitt virális genomok rekombinánsai.

Ez a kísérlet bizonyítja, hogy a virionokból extrahált poxvírus-DNS bepakolódik, amikor helpervírral fertőzött sejtekbe transzfektáljuk a vizsgált körülmények között. Ezért ezeket a körülményeket alkalmaztuk az 1.2 ábrán vázolt közvetlen molekuláris klónozással módosított genomális poxvírus-DNS transzfektálására is.

#### Extracellulárisan módosított poxvírus-DNS pakolása

A vacciniavírus-genomja az NotI szekvenciaspecifikus endonukleáz számára egyetlen hasítási helyet tartalmaz a HindIII F fragmens néven ismert régióban.

A szekvencia tanulmányozása ezen hely környezetében (Goebel és munkatársai, 1990) nyilvánvalóvá tette, hogy az egy gének közötti régióban lokalizálódik, amely nem valószínű, hogy esszenciális a virális replikációhoz. Egy markergén expressziós kazettát konstruáltunk két plazmidban (pN2–gpta és pN2–gptb, 1.3 ábra) oly módon, hogy az E. coli gpt-gént mind a két lehetséges orientációban inzertáltuk. A gpt-gén a 7,5 kD proteint kódoló vacciniavírus-gén promoterének [Cochran és munkatársai, J. Virol. 54, 30–37 (1985)] szabályozása alatt áll (P1-gyel jelölve az 1.2 ábrán, és P7,5-tel az 1.3 ábrán). A teljes markergén-kazetta a fenti plazmidok egyetlen 1,1 kb hosszúságú NotI fragmensében helyezkedik el. A pN2–gpta-ból származó fenti restriktációs fragmenst NotI-gyel emésztett vad típusú WR DNS-sel ligáltuk és helpervírral (WR) fertőzött sejtekbe transzfektáltuk.

Első kísérletsorozatban elvégeztük a fenotipikusan gpt-pozitív utódplakkok genomális szerkezetének Southern-blot-analízisét. A virális izolátumokat háromszor plaktisztítottuk és gpt-szelekció alatt sokszoroztuk. A különböző vírusokkal fertőzött sejtek (CV-1) HindIII-mal emésztett DNS-fragmenseit 1%-os agarózgélben választottuk szét normális elektroforézis és lengett gélelektroforézis kombinációjával. A gélt ezután blottoltuk, és <sup>32</sup>P-jelzett vaccinia WR DNS-sel és egy gpt-szekvenciákat tartalmazó jelzett próbával hibridizáltuk. Az eredmények megerősítették, hogy az összes fenotipikusan marker-pozitív klón tartalmazza az 1,1 kb hosszúságú gpt-inzertet.

Az 1.4 ábrán látható a 9 vírusizolátummal fertőzött sejtekből származó HindIII DNS-fragmensek blotja (4–12. sáv; 2.1.1–7.1.1 plakkok és 10.1.1–12.1.1 plakkok). Megfigyelhetők a gpt-szekvenciákat tartalmazó várt 0,8 kb hosszúságú HindIII fragmensek. A 2. és 3. sávban – ahová a HindIII-mal emésztett vad típusú vírus DNS-t 100, illetve 50 ng mennyiségben vittük fel, nem látható kereszthibridizáció a virális szekvenciákkal.

A következő kísérletsorozatban a 9 különböző plakkal fertőzött CV-1-sejtenyészetek összes DNS-ét NotI-gyel emésztettük. A szétválasztott fragmensek Southern-blotja az 1.5 ábrán látható. Nem várt módon két sáv látható a legtöbb vírusizolátumban, az előre várt 1,1 kb hosszúságú inzert és egy második, nagyobb fragmens. Csak egyetlen plakk, a 7.1.1 számú (8. sáv) mutatta a várt egyetlen 1,1 kb méretnek megfelelő sávot. Noha a nagyobb fragmens hibridizációs jele egyformán erős az összes vizsgált DNS-ben, az 1,1 kb méretnek megfelelő sáv intenzitása DNS-ről DNS-re változik, ami azt jelenti, hogy az 1,1 kb hosszúságú inzert különböző moláris mennyiségekben lehet jelen a különböző genomokban. A vad típusú víruskontroll (2. sáv) nem hibridizál a gpt-gén-próbával.

Ugyanezt a blotot egy vacciniavírus DNS-próbával is hibridizáltuk. Három fragmenst vártunk, mintegy 145 kb, 45 kb és 1,1 kb hosszúságút. A kapott blotképek tartalmazzák a várt sávokat, de egy további, mintegy 5 kb hosszúságnak megfelelő sávot is mutatnak. Csak a 7.1.1 plakk nem tartalmazza a nem várt, 5 kb hosszúságnak megfelelő sávot.

A DNS-inzert orientációját a kiválasztott módosított vacciniagenomokban Southern-blottal is analizáltuk. Amint az 1.2 ábrán látható, a virális DNS-inzert orientációja vagy „a”, vagy „b” lehet, amelyek megkülönböztethetők a DNS-ek megfelelő restrikciós enzimekkel való emésztésével. Előzetes analízisek után a 7.1.1 izolátum – amelyet vp7 klónnak jelöltünk –, úgy tűnt, hogy tartalmazza a várt módosított vírus genomialis szerkezetét, és ezért megsokszoroztuk és tisztítottuk. Ennek a klónnak a DNS-ét a vad típusú vírus DNS-ével hasonlítottuk össze számos restrikciós enzimmel való emésztéssel és agarózgélben lengetett gélelektroforézissel történő szétválasztással (1.6 ábra). A vp7 etidium-bromiddal festett NotI-es emésztési termékében (2. sáv) csak a 145 kb és 45 kb sávok tartalmaztak elegendő DNS-t ahhoz, hogy láthatók legyenek, mivel az 1,1 kb inzert sávja becslések szerint csak mintegy 3 ng DNS-t tartalmaz. Azonban egy gpt-specifikus próbával való hibridizálással láthatóvá vált egy gyenge sáv 1,1 kb-nál (1.7 ábra, 2. sáv).

A HindIII-mal kapott emésztési termékekben megfigyelhetők a várt sávok 1,4 és 0,8 kb-nál. Várható módon a 0,8 kb sáv hibridizált a gpt-gén-próbával (1.6 és 1.7 ábra, 4. sáv). Az NotI-gyel és HindIII-mal kapott kettős emésztési termékekben a várt 0,8 kb fragmens szintén megfigyelhető (1.6 és 1.7 ábra, 6. sáv).

A vp7 DNS PstI-gyel kapott emésztési termékében megfigyelhető az előre várt gpt-szekvenciákat tartalma-

zó 4,1 kb fragmens (1.6 és 1.7 ábra, 8. sáv; az 1.6 ábrán a 4,1 kb méretnek megfelelő etidium-bromiddal festett sáv valójában a 4,1 kb fragmensek dublettje, amelyek közül az egyik tartalmazza a gpt-inzertet). Mind PstI-gyel, mind NotI-gyel való hasítás után a gpt-génkazetta 1,1 kb fragmenseként szabaddá válik (1.6 és 1.7 ábra, 10. sáv).

A fenti és egyéb restrikciós nukleázokkal – beleértve a SallI-gyet (1.6 és 1.7 ábra, 12. sáv) – kapott emésztési minták egybevágnak azzal a feltételezéssel, hogy a vp7 egy stabil módosított vírus, amelyben a gpt-gén a vacciniavírus-genom NotI helyére épült be „a” orientációban (lásd 1.11 ábra).

A klónozási kísérletek második sorozatát kissé módosított körülmények között hajtottuk végre (lásd 1. táblázatot és a fent ismertetett módszereket). 5 különböző ligációs reakcióelegyet (A–E) készítettünk, amelyek azonos mennyiségben tartalmazták az NotI-gyel hasított vacciniavektor-DNS-t, és növekvő mennyiségekben az inzertált DNS-t. A pakolást a vacciniavírussal fertőzött CV-1-sejtekre megadott standard körülmények között végeztük. A gpt-pozitív vacciniavírusok titere az összes esetben mintegy  $1 \times 10^5$  pfu/ $8 \times 10^6$  sejt volt. Az összes klónozási kísérletben a plakkpopuláció méretét tekintve heterogén volt, mintegy fele normális méretű, míg a másik fele a normálisnál kisebb.

1. táblázat

inzertált DNS-vektor DNS-hez viszonyított mennyiségének hatása a módosított vírusok hozamára

|                                     | Kísérlet |      |      |      |      |
|-------------------------------------|----------|------|------|------|------|
|                                     | A        | B    | C    | D    | E    |
| NotI-gyel hasított vektor-DNS (μg)  | 2        | 2    | 2    | 2    | 2    |
| gpt-gén inzert (μg)                 | 0,2      | 0,2  | 0,4  | 0,4  | 0,6  |
| Inzert moláris feleslege            | 17       | 17   | 34   | 34   | 51   |
| T4 ligáz (egység)                   | 5        | 15   | 5    | 15   | 15   |
| gpt-pozitív vírus ( $\times 10^5$ ) |          |      |      |      |      |
| (pfu/ $8 \times 10^6$ sejt)         | 1,12     | 0,88 | 0,96 | 0,96 | 1,16 |

12 gpt-pozitív plakkot izoláltunk, az A, C és E jelű sorozatok mindegyikében 4–4-et, amelyek közül 8 normális méretű (nagy) plakk (A1–4 és C1–4) és 4 kisméretű plakk (E1–4).

Ezen plakkok mindegyikét analizáltuk oly módon, hogy CV-1-sejteket gpt-re szelektív közegben fertőztük, izoláltuk az összes celluláris DNS-t és restrikciós nukleázokkal emésztettük, a fragmenseket FIGE-eljárással elválasztottuk, és nitrocellulóz membránra blottoltuk.

Az 1.8 ábrán mutatjuk be az NotI-gyel emésztett, vacciniavírus-DNS-próbával hibridizáló DNS-mintákat (A1–4: 1–4. sáv; C1–4: 5–8. sáv; E1–4: 9–12. sáv). A gél túltelítettsége miatt a sávok kicsit elkenődnek, azonban a lényeges jellemzők világosan láthatók. A 145 kb és 45 kb méretű sávok adják a fő jelet. Egy ismeretlen eredetű, mintegy 5 kb méretű gyenge sáv látható néhány mintában. A P7,5 promotor gpt-génkazet-

tát tartalmazó 1,1 kb méretű sáv csak 0,6%-át teszi ki a virális genomnak, és hibridizálószekvenciából (azaz a P7,5 promoterből) csak 300 bp-t tartalmaz. Ezért ez a sáv várhatóan nem ad detektálható hibridizációs helyet az alkalmazott körülmények között. A blot hosszabb expozíciójával – amikor a nagyobb sávok erősen túlexponáltak – az 1,1 kb méretű sávok valóban láthatóvá válnak.

Ami a fenotipikusan kis plakkok természetét illeti, az E1, E3 és E4 kis plakkok csak gyenge hibridizációs jeleket adnak (1.8 ábra 9–12. sáv), jelezvén, hogy a vírus ezekben a plakkokban nem replikálódik olyan jól, mint a normális méretű plakkokban (1–8. sávok), ugyanakkor az E2 izolátum nem ad detektálható mennyiségű DNS-t (10. sáv).

Az 1.8 ábrán látható mintákat gpt-gén-próbával is hibridizáltuk (1.9 ábra). Az A1, A4, C1, C2, C4, E3 és

E4 plakkok a várható egyetlen hibridizációs jelet mutatják (1.9 ábra, 1., 4., 5., 6., 8., 11. és 12. sáv). Az A2 plakkban (2. sáv) a gpt-gén a 45 kb méretű sávba integrálódott. (A 145 kb méretű sávban látható gyenge jel egy második mellékes molekulával való szennyeződésnek vagy másodlagos rekombinációs eseményeknek tulajdonítható.) Az A3 plakkban (3. sáv) a gpt-gén-szekvenciák a 145 és a 45 kb méretű sávokba épültek be, míg a C3 plakkban (7. sáv) ezek a szekvenciák a 145 kb méretű sávba és az NotI helyre épültek be. Az A2, A3 és C3 plakkok valószínűleg olyan rekombinások, amelyek az alkalmazott génkazetta-inzertben és a virális DNS invertált ismétlődéseiben jelen lévő homológ szekvenciák rendellenes intracelluláris rekombinációjából keletkeztek.

Ami a vacciniavírus-DNS-próbát illeti, az E1–E4 kis plakkok csak gyenge hibridizációs jeleket mutatnak (1.9 ábra, 9–12. sáv), jelezvén, hogy a vírus ezekben a plakkokban nem replikálódik olyan nagy mértékben, mint a normális méretű plakkokban. A vad típusú vírus-DNS és a nem fertőzött CV-1 celluláris DNS nem hibridizál a gpt-gén-próbával (1.9 ábra, 13. és 15. sáv).

A gpt-gén-inzertek orientációját és példányszámát úgy határoztuk meg, hogy az 1.9 ábrán bemutatott mintákat PstI-vel emésztettük, és Southern-blot-analízisnek vetettük alá. A gpt-gén inzertálásából származó új PstI fragmensek várt mérete az 1.11 ábrán látható. A gpt-gén-próbával való hibridizációval kimutattuk, hogy az A1, A4, C1 és C2 plakkok (1.10 ábra, 1., 4., 5. és 6. sáv) egyetlen 4,1 kb hosszúságú PstI fragmenst tartalmaznak, ami várható az egyetlen inzertre „a” orientációban (1.11 ábra). Az E1 plakkban egy 21 kb méretű sávból származó gyenge hibridizációs jelet figyeltünk meg a blot hosszan tartó expozíciójával, ez a gpt-gén-inzert „b” orientációjának felel meg.

A C4 és E3 plakkok virális DNS-ének szerkezetét (1.10 ábra, 8. és 11. sáv) „b” orientációjú kettős tandem inzertnek felel meg. Ebben az esetben 21 és 1,1 kb hosszúságú hibridizáló fragmenseket vártunk (1.11 ábra). A vírus szerkezetét az E4 plakkban – amely két, egy 4,1 és egy 1,1 kb hosszúságú fragmenst tartalmaz – két gpt-gén tandem inszerciójának felel meg „a” orientációban. Az A2, A3 és C3 plakkokból származó DNS összetettebb képet mutat, jelezvén, hogy az inszerció többszörös helyeken ment végbe, amelyet tovább nem analizáltunk.

Összefoglalva a második klónozási kísérletben 8 normál méretű plakk közül 5 mutatott olyan genomias szerkezetet, amely egyetlen gpt-génkazetta vacciniavírus-genom egyetlen NotI helyére való inszerciója esetén várható volt. A lassabban szaporodó kisméretű plakkok instabil szerkezeteket tartalmaztak, amelyek a további plakk tisztítási lépések során elvesztek.

## 2. példa

*Szelektív markergén (E. coli gpt) klónozása egy módosított avipoxvirus-genom (szárnyaspoxvirus f-TK2a klón) egyetlen (NotI) hasítási helyére*

Ez a példa mutatja be a módosított citoplazmatikus DNS-vírus-genomok közvetlen molekuláris klónozá-

sának általános alkalmazhatóságát olyan módosított avipoxvirus-genomok esetében alkalmazva, amelyeket in vitro állítottunk elő és in vivo pakoltunk. A poxvirus családban az avipoxvirusoknak van a legnagyobb genomja. A szárnyaspoxvirus (FPV) genomja mintegy 300 kb méretű, ezért az idegen géneket expresszáló FPV rekombinánsokat eddig csak markermentési technikákkal lehetett előállítani [lásd például Boyle és Coupar, *Virus Res.* 120, 343–356 (1988); Taylor és munkatársai: *Vaccine* 5, 497–503 (1988)].

Ebben a példában mutatjuk be módosított szárnyaspoxvirus előállítását egy E. coli gpt-gént szabályozó poxvirus promotert tartalmazó génexpressziós kazetta közvetlen molekuláris klónozásával egy rekombináns szárnyaspoxvirus, az f-TK2a genomjában az egyetlen NotI helyre. Ez az NotI hely a lacZ-génben lokalizálódik, amelyet intracelluláris rekombinációval inzertáltunk előzőleg ebbe a rekombinánsba. A manipulált DNS-t HP2 helper-szárnyaspoxvírussal fertőzött primer csirkeembrió-fibroblasztokba pakoljuk, a helper-vírus sokkal lassabban replikálódik, mint az f-TK2a rekombináns. A gpt-pozitív plakkokra való szelekció lehétővé teszi a módosított szárnyaspoxvirusok izolálását. Mivel a lacZ-markergént az NotI helyre való inszercióval inaktiváljuk, az utódvirust az inzertet nem tartalmazó vektorvirustól színtelen fenotípus különbözteti meg a lacZ-gén expressziójára végzett kék plakk vizsgálatban.

## Szárnyaspoxvirus DNS tisztítása

A szárnyaspoxvirus (FPV) HP1 törzset [Mayr és Malicki, *Zentralblatt f. Veterinärmedizin, B* sorozat, 13, 1–12 (1966)] és a gyengített HP1 441 törzset (a HP1 441. átoltása) A. Mayr (München) bocsátotta rendelkezésünkre. A szárnyaspoxvirus HP2 törzset a HP1 441 törzsből kaptuk plakk tisztítással. A primer csirkeembrió-fibroblasztokat (CEF) a 0 338 807 számon publikált európai szabadalmi leírás szerint állítottuk elő. A sejteket 199-es szövettényesztő közegben (TCM 199; Gibco BRL) tenyésztettük, amelyhez 5% magzati borjúsérumot, glutamint és antibiotikumokat adtunk. A szárnyaspoxvirust két egymást követő szacharóz gradienssel tisztítottuk Joklik W. K. módszere szerint [*Virology* 18, 9–18 (1962)]. A vírus-DNS-t proteináz K/SDS-eljárással állítottuk elő Gross–Bellard és munkatársai módszere szerint [*Eur. J. Biochem.* 36, 32–38 (1973)].

## Szárnyaspoxvirus-vektor (f-TR2a) szerkesztése, amely egy inzertált DNS-szegmensben tartalmaz egy egyetlen (NotI) hasítási helyet

A vacciniavírus tk-gént az E. coli lacZ-génnel együtt inzertáltuk a szárnyaspoxvirus tk-génje és 3'-orf-je közötti intergén régióba. A pTKm–VVtka és pTKm–VVtkb plazmidokat úgy szerkesztettük meg, hogy a működőképes vacciniavírus tk-gént a pTKm–sP11 köztes plazmidba klónoztuk. A pTKm–VVtka és pTKm–VVtkb vad típusú szárnyaspoxvirus DNS-sel való intracelluláris rekombinációjával két új FPV vektort állítottunk elő, amelyeket f-TK2a-nak és f-TK2b-nek neveztünk. Mind a két vektor két funkcionális tk-gént, az endogén FPV gént és az inzertált vacciniavírus tk-gént tartalmaz-

za az inzertált lacZ-génen kívül, ezek közül bármelyik alkalmazható nem esszenciális helyként egy idegen DNS inzertálására. Közlebről a lacZ-génben lévő NotI hely egy egyetlen hasítási helyet képvisel az f-TK2a és f-TK2b vektorokban, és ezért előnyösen alkalmazható idegen DNS-ek közvetlen molekuláris klónozására ezekbe a vektorokba. A f-TK2a és f-TK2b szárnyas-poxvírus-vektorok szerkesztésének részletes leírása a Scheifflinger és munkatársai által benyújtott „Rekombináns szárnyas-poxvírus” című amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban található (amelyben a jelen bejelentéssel egy időben benyújtott ekvivalens európai szabadalmi bejelentés elsőbbségét igénylik), amelyek teljes tartalmát referenciaként jelen leírásunkba beépítettük.

#### *In vivo pakolás madársejtekbe*

$8 \times 10^6$  CEF-sejtet  $0,2$  pfu/sejt helpervírussal (HP2) fertőztünk 2 órán keresztül. A módosított FPV genomok pakolására  $1 \mu\text{g}$  tisztított ligációs reakcióterméket alkalmaztunk. A sejteket kalcium-foszfátos kicsapásos technikával transzfektáltuk a DNS-sel (Graham és van der Eb, 1973), és szobahőmérsékleten 15 percen keresztül inkubáltuk. A sejtekhez  $9 \text{ ml}$  tápközeget (TCM 199, 10% magzati borjúsérum, glutamin és antibiotikum) adtunk  $1 \text{ ml}$  csapadékra vonatkoztatva. 4 óra elteltével a tápközeget kicseréltük, és az inkubálást 2 napon keresztül tovább folytattuk. A nyersvírus törzsszuszpenziókat ismert eljárásokkal állítottuk elő (Mackett és munkatársai 1985). A plakkok vizsgálatát és a gpt-szelektálást Scheifflinger és munkatársai módszere szerint végeztük (1991).

#### *Közvetlen molekuláris klónozás szárnyas-poxvírus-genom egyetlen NotI hasítási helyére*

Az f-TK2a rekombináns FPV törzs (Scheifflinger és munkatársai 1991) alkalmas vektorként egy génkazetta közvetlen klónozására, például egy itt ismertetett gpt-génkazetta modell klónozására az egyetlen NotI hasítási helyre. A vektornak ez az NotI helye a lacZ-gén kódolórégiójában van, ami színszűrő markerként szolgál, mivel a gén inszerciója inaktíválja. Ennek megfelelően a lacZ-pozitív vírusok kék plakkokat képeznek a kromogén X-Gal szubsztát jelenlétében, míg azok a vírusok, amelyek az NotI helyen inzertet tartalmaznak, fenotipikusan fehér plakkot képeznek. Az f-TK2a vektor genomjába a vacciniavírus timidin-kináz (tk)-gén is be van építve, amely alternatív génszerciós régióként szolgál. Mind a lacZ-gén, mind a tk-gén hagyományos módszerekkel van beillesztve a szárnyas-poxvírus timidin-kináz gén és a 3'-nyitott leolvasási keret közötti intergénrégióba (Scheifflinger és munkatársai 1991).

Mind a HP1.441 FPV vírusok genomiális DNS-ében, mind a vektor f-TK2a törzsben elvégeztük a DNS hasítását NotI-gyel (2.1 ábra). A HP1.441 virulens FPV törzsből származik csirkeembrió-fibroblasztokba való sorozatos átoltással végrehajtott gyengítéssel. A HP1.441 a HP1 441. átoltása, és ezt szárnyashimlő elleni vakcina törzsként alkalmazzák (Mayr és Malicki 1966), ez a törzs képes sejtenyészetekben gyorsan replikálódni.

A HP1.441-ből származó DNS-t összehasonlító anyagként analizáltuk az FPV vektor f-TK2a törzs

vizsgálatára, amely a HP1.441-ből származik. A HP1.441 DNS-ének restrikciós analízise (2.1 ábra, 1. és 2. sáv) azt mutatja, hogy ebben a törzsben nincsen NotI hely. Az f-TK2a vektor DNS NotI-gyel való hasítása két nagy fragmenst eredményez, amelyek mérete mintegy  $100$  és  $200 \text{ kb}$  (2.1 ábra, 4. sáv).

#### *A gpt-gént expresszáló szárnyas-poxvírus közvetlen molekuláris szerkesztése*

A pN2-gpta plazmidban megszerkesztettünk egy *E. coli* gpt-gént tartalmazó génexpressziós kazettamodellt, melyben a gpt-gén NotI helyekkel határolt korai/késői poxvírus promotor szabályozása alatt áll (1.3 ábra).

Az f-TK2a vektorba való klónozáshoz a gpt-génkazettát a plazmidjából kivágtuk, és ligáltuk az NotI-gyel hasított f-TK2a genomiális DNS-ével, amint azt a 2.2 ábra mutatja. A ligált DNS-t szárnyas-poxvírus helpervírussal fertőzött CEF-sejtekbe transzfektáltuk. A gpt-pozitív plakkokat – amelyek fehérék maradtak az X-Gal-t tartalmazó felső réteg alatt – csirkeembrió-fibroblasztok fertőzése után Southern-blotlalt tovább analizáltuk. Izoláltuk az összes celluláris DNS-t és az elválasztott NotI fragmenseket a helper-szárnyas-poxvírus (HP2)  $^{32}\text{P}$ -jelzett DNS-ével és gpt-gén-szekvenciákkal vizsgáltuk Southern-blot-analízissel az 1. példában leírtak szerint. A gpt-gént az  $1,1 \text{ kb}$  hosszúságú NotI fragmensben tartalmazó gpt-pozitív vírusok azt jelzik, hogy a klónozási lépésben helyes ligálás ment végbe.

#### *Az inzertet mindkét orientációban tartalmazó módosított vírusok előállítását egyetlen lépésben*

Ebben a példában azt is bemutatjuk, hogyan lehet ki-nyerni egyetlen közvetlen molekuláris klónozási lépésből olyan vírusokat, amelyek az inzertált génkazettát egyetlen példányban tartalmazzák valamelyik orientációban, illetve olyan vírusokat, amelyek az inzertált gén több példányát tartalmazzák. A DNS-inzert orientációját a vizsgált módosított szárnyas-poxvírus-genomokban megfelelő restrikciós enzimekkel hasított DNS-ek Southern-blot-analízisével lehet meghatározni. Amint az a 2.2 ábrán látható, a virális DNS-be inzertált DNS az „a” és „b” orientáció egyikében lehet. A jelen génkazettamoddellel az inzertek számának és orientációjának előzetes vizsgálatára például a kiválasztott plakkokkal fertőzött sejtek teljes DNS-ét ClaI és NotI restrikciós endonukleázzal hasítjuk, és  $0,8\%$ -os agarózgélben szétválasztjuk. A blotot gpt-gén-próbával és szárnyas-pox-vírus-próbával hibridizáljuk.

A rekombináns vírusok NotI-gyel emésztett DNS-mintáiban a gpt-génkazetta  $1,1 \text{ kb}$  hosszúságú fragmensként hasítódik ki. Azon DNS-ek ClaI-gyel való hasítása, amelyek egy inzertet tartalmaznak „a” vagy „b” orientációban, szintén különböző jellegzetes fragmenseket eredményez, amelyek egy gpt-gén-próbával hibridizálnak, amint az a 2.2 ábrán látható szerkezetekből megállapítható.

#### *3. példa*

*Módosított ortopoxvírus (vacciniavírus) genomiális DNS heterológ pakolása avipox (szárnyas-pox) helpervírussal és a rekombinánsok szelektálása ezt kö-*

*vetően olyan gazdasejtfajtákban, amelyekben a helpervírus nem tud replikálódni*

A poxvirus-DNS heterológ pakolása – például egy ortopoxvirus-DNS pakolása egy avipoxvírussal – eddig még nem volt ismertetve a szakirodalomban. Ebben a példában bemutatjuk, hogy extracellulárisan módosított vacciniavirus-DNS in vivo pakolható szárnyaspoxvírussal csirkeembrió-fibroblasztokban. A helpervírustól eltérő gazdaspecificitással rendelkező vektorvirus alkalmazása egyszerű és hatékony eljárást biztosít a módosított vírus tisztítására egyetlen plakvizsgálati lépésben. Így a jelen példában a rekombináns ortopoxvírust plakvizsgálattal nyertük ki emlős (CV-1)-sejtekben, amelyek a helper-avipoxvirus teljes replikációját nem engedik meg. A vektorba inzertált DNS-be egy domináns szelektív marker beépítése elősegíti a szelektív plakvizsgálati körülmények alkalmazását olyan vírusok kizárására, amelyek a kívánt inzerttől mentes vektor-DNS-t tartalmaznak.

A heterológ pakolási módszer másik előnye, hogy kisebb az esély a vektor- és a helpervírusok közötti rekombinációra. Így például az ortopox- és avipoxvírusok különböző génuszokba tartoznak, amelyek különböző morfológiával és replikációs tulajdonságokkal rendelkeznek, és csak minimális szekvenciahomológiát mutatnak, amit standard hibridizációs körülmények között a kereszthibridizáció hiánya bizonyít. Ezért az avipox- és ortopoxvírusok genomjainak homológ rekombinációja nagyon valószínűtlen, és a fenti két vírus alkalmazásával gyakorlatilag elkerülhetők a nem kívánt rekombinációs események, amelyek gyakran végbemennek a közeli rokon vírusok homológ szekvenciái között [Fenner és Comben, Virology 5, 530–548 (1958); Fenner, Virology 8, 499–507 (1959)]. A pakolás során a vektor- és a helpervírus közötti rekombináció kiküszöbölésének egy másik módja az, hogy rekombinációhiányos vírustörzseket vagy gazdasejteket alkalmazunk.

Ebben a példában egy markergént (poxvirus promoter szabályozása alatt álló E. coli gpt-gént) tartalmazó expressziós kazettamodellt inzertálunk extracellulárisan a vacciniavirus-DNS egyetlen SmaI helyére. A virális DNS hasítására alkalmazott fenti restrikciós enzim tompa végeket alakít ki, amelyek előnyösen bármely egyéb, tompa végű hasítást eredményező nukleázzal előállított tompa végű DNS-inzerttel ligálhatók, vagy például egy polimerázt vagy exonukleázt alkalmazhatunk a tompa végek kialakítására egyszálú végekkel rendelkező inzertekből.

A vírus pakolására a módosított genomiális DNS-t szárnyaspoxvírussal fertőzött gazdasejtekbe transzfektáljuk, amelyekben mind a vacciniavírusok, mind a szárnyaspoxvírusok képesek replikálódni (csirkeembrió-fibroblasztok). Mivel a helper-szárnyaspoxvirus gazdaspecificitása madáresejtekre korlátozódik, a vacciniavirus-klónokat emlős gazdasejtekben (afrikai zöldmajomvesesejtek, CV-1) szelektáltuk az utódok plakktisztításával a transzfektált sejtekből. A gpt-gén expresszióra való párhuzamos szelektálást alkalmaztunk a csak módosított vacciniavírusok izolálására. A pox-

vírus rekombinánsok előállítására hagyományosan alkalmazott eljárással szemben – amelyben egyetlen intracelluláris genetikusan keresztezésben rendszerint az idegen génnek csak egy példányát tudjuk beilleszteni az egyik orientációban – a jelen példában az egyetlen inzert mindkét lehetséges orientációját, továbbá a génkazetta-modell kettős inszercióját is kimutattuk egyetlen extracelluláris genomiális módosítóreakció termékeiben.

A jelen példa kísérleti eredményei azt mutatják, hogy a ligált vacciniavirus-DNS-ek helper-szárnyaspoxvirus általi pakolásának hatékonysága alacsony az intakt vacciniavirus-DNS szárnyaspoxvírussal való pakolásával összehasonlítva, amelynek hozama 3 napos replikáció után  $5 \times 10^3$  –  $1 \times 10^4$  pfu/ $6 \times 10^6$  csirkeembrió-fibroblaszt. Az egyik pakolási kísérletben (amelyben az F12 plakksorozatot állítjuk elő) a pakolt módosított vírus hozama  $9 \times 10^2$  pfu és egy másik kísérletben (amellyel az F13 sorozatot állítjuk elő)  $5 \times 10^2$  pfu/ $6 \times 10^6$  csirkesejt. A fenti, viszonylag kis pakolási gyakoriság egyik oka ezekben a kísérletekben az, hogy hiányzik a vektor-DNS-karok defoszforilezéses kezelése, és ezért ezek képesek inzertek nélkül is újraligálódni. A fenti kezelést azért mellőztük, mivel a tompa végű DNS-fragmensek defoszforilezése rendszerint nem kielégítő. Ezt a problémát ragadós végű, többszörös hasítási hellyel rendelkező gazdavirus törzsek szerkesztésével küszöbölhetjük ki, amelyek nem képesek az irányított kényszerített klónozásra, ezáltal az idegen DNS-fragmensek inszerciója sokkal hatékonyabb.

A pakolás hatékonyságát befolyásoló másik faktor az a helper- és a pakolt vírus közötti interferencia celluláris szinten. Standard pakoló körülmények között 3 napos inkubáció alatt a helpervírus (szárnyaspoxvirus) rendszerint mintegy  $1 \times 10^8$  pfu/ $6 \times 10^6$  csirkeembrió-fibroblaszt titerre replikálódik. A szárnyaspoxvirus nagy feleslege a pakolt vacciniavírushoz képest olyan feltételeket teremt, amelyek negatív interferenciajelenséget produkálnak, és gátolják a pakolt vírus replikációját.

Ezt az interferenciát minimálisra csökkenthetjük, ha a pakolásra emlőssejteket használunk helper-szárnyaspoxvírussal kombinációban a 7. példában leírtak szerint. Ebben az esetben a gazdasejtek nem segítik elő a segítő szárnyaspoxvirus teljes replikációját. Noha a ligált vacciniavirus-DNS szárnyaspoxvirus általi pakolási hatékonyságát nem vizsgáltuk emlős gazdasejtben, nem hasított vacciniavirus-DNS-sel a pakolás hozama  $2 \times 10^6$  pfu/ $8 \times 10^6$  emlős (CV-1)-sejt volt.

Az egyes virális rekombinánsokban – amelyeket egy adott inszerciós plazmid intracelluláris rekombinációjával állítunk elő – az inzertnek egy orientációja van a homológ határoló-régió polaritásától függően a plazmidban. A transzkripció interferenciajelenség következtében [például (Ink és Pickup 1989)] az egy poxvirusvektorba inzertált gén expressziós szintje az idegen gén virális genomhoz viszonyított orientációjától függ. Ezért előnyös, hogyha egyetlen reakciólépésben elő tudunk állítani olyan vírusokat, amelyek mindkét lehetséges orientációval rendelkeznek. Az e példában ismertetett eljárás egyik előnye, hogy egyetlen

ligálási reakcióban előállítjuk az inzertált DNS mindkét lehetséges orientációját, ezáltal azonnal kiszűrhetjük azokat a variánsokat, amelyek a legnagyobb expressziós szinttel rendelkeznek. Ebben a példában a kazetta előnyös orientációja a vacciniavírus választott SmaI inszerciós helyén a „b” orientáció, amit az a tény bizonyít, hogy a módosított vírusok többsége ezzel a genomális szerkezettel rendelkezik. Ebben a kazettában az idegen gént szabályozó P7,5 promoter invertált ismétlődő orientációban van az endogén 7,5 kD polipeptidgénhez viszonyítva. Amint az 1. példában említettük, az endogén 7,5 kD méretű polipeptidgénnek a vacciniavírus-genom invertált terminális ismétlődéseiben lokalizálnak. A gpt-gén P7,5 promoterének és a bal terminális ismétlődésben lévő P7,5 promoternek a távolsága mintegy 20 kb. Ezért az „a” orientációnak kevésbé stabilnak kell lennie, és ezért kisebb gyakorisággal keletkezik, összhangban azzal a megfigyeléssel, hogy ezt az orientációt csak két esetben tudtuk kimutatni. Azonban az F13.4 vírusizolátumot („a” orientáció) és a vF12.5 vírusizolátumot („b” orientáció) gpt-szelektálással nagy léptékben szaporítottuk, és azt találtuk, hogy stabil, előre várt szerkezettel rendelkeznek. A többszörös inzertet tartalmazó különböző szerkezetek szelekció nélküli stabilitását még ezután kell meghatározni.

A ligációs elegyek többszörös feleslegben tartalmazták az inzertet a vektorhoz képest, ezáltal a megfigyelések szerint előtérbe került a kazetta több példányának inszerciója. Azonban az nem világos, hogy ebben a példában miért találtunk gyakrabban kettős inszerciót, mint az 1. példában. A belső rekombinációs események következtében csak bizonyos többszörös inzertkonfigurációk lesznek várhatóan stabilak. További tanulmányokat kell végezni a többszörös inzertet tartalmazó vírusok stabilitásának kiértékelésére, és az optimális vektor:inzert arány meghatározására a megfelelő stabilitás és expressziószint biztosítására, ami az inzert példányszámától függ, és minden egyes termék esetén meghatározásra szorul a találmány értelmében.

#### *Vírus és DNS tisztítása*

Az 1. és 2. példában ismertetett eljárásokat és vírusokat alkalmaztuk.

#### *Vírus-DNS módosítása*

A virionokból tisztított vírus-DNS-t SmaI-gyel hasítjuk, és egy fenolos és három kloroformos extrahálással tisztítjuk. Az alábbi első kísérletsorozatban 2 µg hasított vírus-DNS-t ligálunk 400 ng (34-szeres mólfelesleg) inszerciós fragmenssel (a pTKgpt-F1s plazmidból kivágott 1,1 kb hosszúságú HpaI-DraI fragmens) 30 µl térfogatban 40 órán keresztül 15 egység T4 ligázzal (Boehringer, Inc.). A második ligációs kísérletet ugyanilyen körülmények között végezzük, azaz az eltéréssel, hogy az 1,1 kb hosszúságú SmaI inzertet 17-szeres mólfeleslegben alkalmazzuk, és 5 egység ligázt használunk.

#### *In vivo heterológ pakolás madársejtekben*

6 × 10<sup>6</sup> csirkeembrió-fibroblasztot 0,5 pfu/sejt HP1.441 helpervírusal fertőzünk, és 2 órán keresztül inkubáljuk. 2 µg ligált DNS-t transzfektálunk a fertő-

zott sejtekbe, és az 1. példában a homológ pakolásra ismertetett eljárás szerint kezeljük tovább. Az első plakvizsgálatot CV-1-sejtekben végezzük az 1. példában leírtak szerint.

#### *Módosított vacciniavírus-DNS helper-szárnyaspoxvírussal való pakolásának bizonyítása*

A kísérleti elrendezés a 3.1 ábrán látható. A vacciniavírus genomális DNS-t szacharóz gradiensen tisztított virionokból állítjuk elő, SmaI restrikciós endonukleázzal hasítjuk, és tompa végű idegen génkazettával ligáljuk. A ligált DNS-t szárnyaspoxvírussal fertőzött csirkeembrió-fibroblasztokba transzfektáljuk pakoláshoz. Az utódvírust plakvizsgálattal azonosítjuk emlős (CV-1)-sejtekben, amelyek nem segítik elő a szárnyaspoxvírus teljes replikációját, hogy fertőző virionokat képezzenek.

Az eljárást részletesebben az alábbiakban ismertetjük. Első lépésben a pTKgpt-F1s plazmidból (Falkner és Moss, 1988) kivágjuk a vacciniavírus P7,5 promoter által szabályozott gpt-gént tartalmazó génkazetta-modellt hordozó HpaI-DraI fragmenst, és közvetlenül ligáljuk a vad típusú vacciniavírus (WR-törzs) egyetlen SmaI helyére. A gpt-gént azért választottuk, hogy lehetővé tegye a módosított vírusok pozitív szelekcióját (Boyle és Coupar, 1988; Falkner és Moss, 1988). A vacciniavírus-DNS-ben az egyetlen SmaI hely a genom HindIII A fragmensében, az A51R nyitott leolvasási keretben lokalizálódik. Az A51R gén nem esszenciális a virális replikációhoz sejtenyészetben (Goebel és munkatársai, 1990).

A ligált anyagot helper-szárnyaspoxvírussal fertőzött csirkeembrió-fibroblasztokba transzfektáljuk. 3 nap elteltével a sejteket összegyűjtjük, és előállítjuk a nyersvírus törzsszuspenziót. A pakolt vacciniavírust plakvizsgálattal azonosítjuk afrikai zöldmajomvese-sejt-vonalban (CV-1) olyan tápközegben, amely lehetővé teszi a gpt-gént hordozó vírussal fertőzött sejtek szelektálását. Ezzel a szelekciós módszerrel megakadályozzuk az önmagával ligált vad típusú vacciniavírus-DNS-t tartalmazó vírusok plak-képzését, és elősegítjük az inzertált gpt-génkazetta modellt tartalmazó módosított vírusok plak-képzését.

A kezdeti kísérletekben a pakolás gyakorisága kicsi volt. A gpt-pozitív vacciniavírus titere a 6 × 10<sup>6</sup> csirkeembrió-fibroblasztból előállított nyerstörzs szuszpenzióban 1 × 10<sup>2</sup> – 1 × 10<sup>3</sup> pfu volt.

13 gpt-pozitív plakot szaporítottunk gpt-szelekciós körülmények között CV-1-sejtben. Izoláltuk a fertőzött sejtek összes DNS-ét, HindIII-mal emésztettük, 0,7%-os agarózgélben szétválasztottuk, és gpt-gén-próbával Southern-blot-analízissel analizáltuk. A 3.2 ábrán látható, hogy számos vírust kaptunk, amely a különböző módosított genomális szerkezetekre előre várható képet mutatja.

A 2., 4., 11. és 13. sávban (az F12.3, F12.5, F13.3 és F13.5 plakkoknak felel meg) mintegy 45 kb hosszúságú hibridizáló fragmens látható, amely akkor várható, ha a génkazetta egyetlen példányban van inzertálva a vírusgenomba „b” orientációban (lásd a 3.3 ábrát). Egy előre várt új, 5,2 kb hosszúságú fragmens is jelen

van minden esetben, amelyek akkor is láthatók, hogy ha ugyanezeket a DNS-eket vacciniavírus-próbával vizsgáljuk a 3.2 ábrán bemutatott módon.

Két „a” orientációnak megfelelő képpel rendelkező vírust találtunk a 7. és 12. sávban (az F12.8 és F13.4 számú plakknak felel meg), ahol egyetlen gpt-vel hibridizáló, mintegy 5,7 kb hosszúságú fragmenst vártunk. A 7. sávban az 5,7 kb hosszúságú fragmens jobban látszik az autoradiográf hosszabb expozíciója esetében. Az 5. sávban látható kép (F12.6 plakk) „a” orientációban lévő egyetlen inzertet jelenthet, de a várt 5,7 kb hosszúságú sáv valamivel nagyobb ismeretlen okok miatt.

3 vírusizolátum mutat „a” orientációjú tandem inszerciónak megfelelő képet (1., 6. és 10. sáv, amelyek az F12.2, F12.7 és F13.2 plakknak felelnek meg). Ezekben az esetekben két gpt-pozitív hibridizáló fragmens várható, amelyek 5,7, illetve 1,1 kb hosszúságúak (lásd még a 3.3 ábrát). Az 5,7 és 1,1 kb hosszúságú fragmensek a vírus-DNS ekvivalens mennyiségei esetében vacciniavírus-próbával hibridizált blotban is megfigyelhetők.

A 3. sávban lévő izolátum genomja (F12.4 plakk) valószínűleg egy tandem kettős inzertet tartalmaz „b” orientációban. Ebben az esetben két fragmens, egy 45 kb és egy 1,1 kb hosszúságú fragmens fog várhatóan hibridizálni a gpt-génnel.

A 9. sávban lévő vírus-DNS (F13.1 plakk) egy fejfej kettős inszerciót tartalmazhat. Ebben az esetben várhatólag egy 45 kb és egy 5,7 kb hosszúságú fragmens fog hibridizálni a gpt-gén-próbával. Azonban ezenkívül az ilyen DNS-ben kell lennie egy új, 0,6 kb hosszúságú fragmensnek is, amely vaccinia-DNS-próbával hibridizál, és ténylegesen ezt a fragmenst ki is mutattuk a vacciniapróbával hibridizált blotban. Azonban a várt 5,7 kb hosszúságú fragmens valamivel kisebb volt, mint az előre megjósolt, és a vártnál gyengébb hibridizációs jelet produkált. Ezért ezen rekombináns szerkezetének megerősítése még részletesebb analízist igényel.

A további analízissel kiderítettük, hogy az F12.7 és F12.3 vírusok, amelyeket fent mint „a” konfigurációjú kettős tandem inszerciót tartalmazó vírusokat és az F12.4 vírus, amelyet mint „b” szerkezetű kettős tandem inszerciót tartalmazó vírust jellemeztünk, valójában több tandem inzertet tartalmaznak „a”, illetve „b” orientációban. A 3.2 ábrán látható Southern-blot-analízis nem tesz különbséget a kettős tandem és a többszörös tandem inzertek között.

#### 4. példa

*Irányított mesterklónozóhellyel rendelkező ortopoxvírus (vacciniavírus) vektor (vdTR) és kompatibilis expressziós kazettával rendelkező plazmidok szerkesztése*

Ebben a példában mutatjuk be a találmány szerinti eljárások alkalmazását új poxvírusklónozó vektorok előállítására a meglévő poxvírusgenomok direkt molekuláris módosításával és klónozásával. Közelebbről ebben a példában egy olyan vacciniavírus-vektort (vdTK) ismertetünk, amely lehetővé teszi idegen gének irányí-

tott inszercióját (azaz kényszerített klónozását) egy rövid, többszörös klónozóhelyet tartalmazó szegmensbe, amely különböző olyan endonukleáz hasítási helyeket tartalmaz, amelyek mindegyike egyedi a vektorgenomban. A kényszerített klónozással feleslegessé válnak a szelekciós vagy szűrővizsgálatok a kívánt rekombinánsok megkülönböztetésére az inzertet nem tartalmazó vektorvírustól, mivel a különböző nukleázokkal hasított DNS-végek inkompatibilitása lehetetlenné teszi az idegen inzertet nem tartalmazó vektorkarok újbóli ligálását. Ennek következtében a kényszerített klónozási módszer a leghatékonyabb módja idegen gének virális vektorba való inzertálására.

Az irányított vdTK vektort úgy állítjuk elő, hogy egy egyedi NotI, SmaI, ApaI és RsrII helyet tartalmazó többszörös klónozóhelyet inzertálunk a vacciniavírus timidin-kináz (tk)-génjének helyére (lásd 4.1A ábra). Ez a nem esszenciális lokusz az a hely, amelyet leggyakrabban alkalmaznak idegen gének vacciniavírusba való inzertálására, főleg azért, mert a tk-negatív vírusok pozitívan szelektálhatók. Így ha a ligált vdTK vektor-DNS-t egy tk-pozitív helpervírussal pakoljuk, a vektorvírust pozitívan szelektálhatjuk a helpervírus feleslegétől. Ezenkívül az idegen DNS-vacciniavírus tk-lokuszába való inzertálása hagyományos módszerekkel rendszerint stabil rekombinánsokat eredményez.

Az új vdTK vektor többszörös klónozóhelye NotI és SmaI hasítási helyet tartalmaz, amelyek a vektorban egyetlenek. A többszörös klónozóhely inzertálása előtt a vad típusú vacciniavírusban (WR-törzs) eredetileg jelen lévő NotI és SmaI hasítási helyeket a találmány szerinti közvetlen molekuláris módosítással töröljük. A kívánt módosításokkal rendelkező vírusokat olyan szűrővizsgálati módszerekkel detektáljuk, amelyek a specifikus nukleinsavszekvenciák megsekszorozására alkalmazott polimeráz láncreakciós (PCR) módszeren alapulnak.

A példában egy sor olyan plazmidot is ismertetünk, amelyek elősegítik a vdTK vacciniavektorban lévő teljes vagy részleges nyitott leolvasási kereteket kódoló DNS-ek expresszióját. A találmány magában foglalja a nyitott leolvasási keretek közvetlen inszercióját egy poxvírus expressziós vektorba, amely minden megfelelő szabályozóelemmel rendelkezik megfelelő elrendezésben az inzertált nyitott leolvasási keret expressziójára. Azonban a jelen vdTK vektorban nincsenek jelen ilyen regulátorszekvenciák egy olyan inzertált nyitott leolvasási keret expressziójára, amelyből hiányoznak a saját transzkripció és transláció jelek. Ennek megfelelően a példa szerinti plazmidok célszerű génexpressziós kazettákat jelentenek nyitott leolvasási keretek rutinszerű kötésére poxvírus promoterekhez és adott esetben egy translációs startkodonhoz. A nyitott leolvasási keretet és a hozzá kapcsolt szabályozószekvenciákat ezután irányított klónozással hatékonyan bevihetjük a vdTK vektor mesterklónozóhelyére. Az inzertet a két orientáció bármelyikében tartalmazó módosított vírusokat két plazmid egyikét alkalmazva állíthatjuk elő, amelyek az expressziós kazettát a kívánt orientációban tartalmazzák mesterklónozóhelyükön. A példában bemuta-

tott plazmidok génexpressziós kazettái két beépített restriktációs enzim hasítási hely sorozatot tartalmaznak a nyitott leolvasási keretek klónozásának elősegítésére a vdTK vektorban. A kazetták olyan mesterklónozóhely-  
5 helyel rendelkeznek, amelyek ugyanazon egyedi hasítási helyeket tartalmazzák, mint a vdTK vektor mesterklónozóhelye. Ezenkívül a fenti mesterklónozóhely közepén a kazetták számos gyakori hasító enzim helyet tartalmaznak, amely nyitott leolvasási keretek kazettákba való inzertálására alkalmas. Ennek megfelelően azok a  
10 DNS-ek, amelyeket a kazettába gyakori hasító helyek segítségével inzertáltunk, mindkét oldalukon néhány különböző egyedi hasítási hellyel vannak határolva, amelyek alkalmasak a kazetta irányított klónozására a vdTK vektor mesterklónozóhelyére.

Ebben a példában ismertetünk olyan génexpressziós kazettákat is, amelyek alkalmasak egyetlen egyedi hasítási hely inzertálására a vdTK vacciniavírus-vektorba. A vektor-DNS hasítására egyetlen enzim alkalmazásából adódó csökkent klónozási hatékonyság ki-  
20 küszöbölésére ezeknek a plazmidoknak az expressziós kazettái szelektív markerként egy *E. coli* gpt-gént tartalmaznak.

A vdTK vacciniavektor-rendszert előnyösen a 3. és 7. példában ismertetett heterológ pakolási eljárással összekapcsolva alkalmazzuk. A gpt-markert tartalmazó plazmidok gpt-markergén nélküli homológ helpervírusokkal is alkalmazhatók. A polipeptidek expressziójára vdTK vektort és rokon plazmid rendszereket alkalmazó szerkezetekre példákat az 5. példában ismertetünk.

A fenti előnyökön kívül a találmány szerinti expressziós kazetta plazmidok alkalmasak azon általános probléma megszüntetésére is, amelyek a hasított poxvírusvektor-DNS-ek végei és több inzert DNS közötti inkompatibilitásból adódnak célszerű lehetőségként a szokásos szintetikus adapter DNS-szegmensek alkalmazása helyett. Így a nyitott leolvasási kereteket kódoló DNS-fragmensek izolálását rendszerint megkönnyíti olyan restriktációs endonukleázok alkalmazása, amelyek rövid és ennek következtében minden természetes DNS-szekvenciában nagy gyakorisággal előforduló felismerőszekvenciákkal rendelkeznek. Másrésztől az ilyen gyakori hasító enzimek rendszerint nem alkalmasak az olyan nagy genomokba való közvetlen klónozásra, mint a poxvírusok genomja, például azért, mert az ilyen enzimek a nagy DNS-eket több fragmensre hasítják. Ezen fragmensek újraligálása statisztikusan megy végbe, és ezáltal kevés intakt virális genom keletkezik. Ezért egy vacciniavektorban az inszerciós helyek előnyösen a nem gyakori hasító restriktációs endonukleázok hasítási helyei, amelyeket általában nem alkalmaznak nyitott leolvasási keret fragmensek vagy DNS-inzertek izolálására. A találmány szerinti plazmidokban úgy küszöböljük ki ezt az általános inkompatibilitást, hogy a gyakori hasító enzimekkel kapott fragmensek hatékony inszercióját lehetővé tesszük a plazmidban, majd nem gyakori hasító enzimek alkalmazásával hatékony transzfert biztosítunk a vacciniavektorba.

*Egyetlen NotI hasítási hely törlése vad típusú vaccinia (WR)-vírusból*

A vacciniavírus egyetlen NotI helyét úgy eliminálhatjuk, hogy erre a helyre inzertálunk egy „NotI deléciós adapter” szegmenst, amely az NotI-gyel hasított DNS-sel való ligálás céljára kompatibilis végekkel rendelkezik, de nincsenek benne olyan szekvenciák, amelyek az NotI endonukleáz általi felismeréshez szükségesek. Ezért azok a szekvenciák, amelyek az NotI-gyel hasított vírus-DNS és a vírus-DNS és az adapter ragadós végeinek ligálásával keletkeznek, nem hasíthatók NotI-gyel. Ez az adapter több választott restriktációs endonukleáz hasítási helyet is tartalmaz a DNS-fragmensek irányított inszerciójához.

Közelebbről úgy járunk el, hogy 1 µg vad típusú (WR) vacciniavírus-DNS-t NotI-gyel hasítunk, és 1 µg kettős szálú NotI deléciós adatterral ligáljuk. Az adapter két részlegesen komplementer szárból áll: odN1 (16. azonosítási számú szekvencia) és odN2 (23. azonosítási számú szekvencia). Az adapter központi része tartalmazza az StuI, DraI, SspI és EcoRV restriktációs endonukleáz hasítási helyeket. A ligációs reakcióhoz illesztett adapter oligonukleotidokat alkalmazzunk. A ligált anyagot szárnyaspoxvírussal fertőzött csirkeembrió-fibroblasztokba transzfektáljuk, és a 3. példában leírtak szerint pakoljuk.

A vacciniavírus (WR-törzs) egyetlen NotI helyének törlésére egy másik eljárást a 4.1 ábra B részében ismertetünk. Első lépésben a vacciniavírus-DNS-t SatI-gyel hasítjuk, az SatI „I” fragmenst izoláljuk az alacsony olvadáspontú agarózból, és egy megfelelő plazmid, például a pTZ19R (beszerezhető a Pharmacia, Inc.-től) SacI helyére klónozzuk. A kapott pTZ–SacI plazmidot NotI-gyel hasítjuk, Klenow-polimerázzal kezeljük a ragadós végek betöltésére, és újraligáljuk. A ligált anyagot *E. coli* sejtekbe (HB101) transzfektáljuk. A telepeket standard klónozóeljárásokkal izoláljuk. A kapott pTZ–SacIdN plazmidból hiányzik az NotI hely, és ezt alkalmazzuk egy reverz gpt-szelekciós kísérletben  
35 Isaacs, S. N., Kotwal, G. és Moss B. módszere szerint [Virology 178, 626–630 (1990)] az alábbi módosításokkal.

$8 \times 10^6$  CV-1-sejtet 0,2 pfu vp7 vírusizolátummal (vacciniavírus, amely az egyetlen NotI helyre beépítve egy gpt-génkazettát tartalmaz, lásd az 1. példát) fertőzünk, ezt követően a sejteket pTZ–SacIdN plazmidból előállított módosított SacI fragmensből származó 20 µg DNS-t tartalmazó kalcium-foszfátos precipitátummal transzfektáljuk. A sejteket ezután az 1. példában ismertetett pakolóeljárással kezeljük. A nyersvírus törzsszuszenziókat használjuk STO egérsejtek (American Type Culture Collection, Rockville, MD; ATCC CRL 1503) fertőzésére 6-tioguanin (6-TG) jelenlétében. Ez egy negatív szelekciós eljárás, amelyben a vírus replikációjához a gpt-gén hiánya szükséges (Isaacs és munkatársai, 1990), és ezért a jelen esetben a módosított SacI „I” fragmens integrálódásához és ezáltal a gpt-gén deléciójához vezet. Azok a plakkok, amelyek 6-TG jelenlétében szaporodnak, szükségszerűen nem tartalmaznak gpt-gént, és módosított SacI I fragmenst tartalmaznak. A becsült hozam az összes plakkok mintegy 0,1–0,2%-a (vagyis azonos az ilyen típusú marker mentési kísérle-  
60

tekben a rekombinánsok normális gyakoriságával). Mivel a szelekciós eljárás igen hatékony (Isaacs és munkatársai, 1990), a helyes szerkezetek azonosításához várhatólag nem szükséges nagyszámú klón átvizsgálása. A kívánt szerkezet felismerésére az alábbi szűrővizsgálatot alkalmazzuk függetlenül attól, hogy a vacciniavírus egyetlen NotI helyének törlésére a fent ismertetett két eljárás közül melyiket alkalmaztuk.

*NotI hely hiányos vírus (vdN) azonosítása PCR-szűrővizsgálattal*

Azokat a vacciniavírus-klónokat, amelyekből az NotI helyet töröltük, CV-1-sejtekben szaporodó plakkok analizálásával azonosíthatjuk, amely sejtvonal nem engedi meg a helper-szárnypoxvírus szaporodását. Egyes plakkokban a vírusok DNS-ét PCR alapú szűrővizsgálati módszerrel analizáljuk az alábbiak szerint.

A PCR-reakcióhoz az első primer az odN1 oligonukleotid (16. azonosítási számú frekvencia), a második primer az odN3 (24. azonosítási számú frekvencia). A második primer szekvenciája a vacciniavírus-genomban mintegy 770 bp-vel az első primer szekvencia után (5'-irányban) helyezkedik el. A templát az egyetlen plakknál vírus felével fertőzött  $1 \times 10^6$  CV-1-sejtből származó összes DNS. A DNS-t standard módszerrel állítjuk elő, és mintegy 50 ng-ot alkalmazunk a PCR-reakcióban. A PCR-reakciókat szokásos módon hajtjuk végre kereskedelmi forgalomban kapható PCR készletek alkalmazásával. Pozitív PCR-reakciókkal egy mintegy 770 bp hosszúságú DNS-fragmenst kapunk. Azt a vírust, amelyből az NotI helyet delécióval töröltük, vdN-nek nevezzük.

*Egyetlen SmaI restrikciós hely deléciója vdN vacciniavírusból*

A vacciniavírus WR-törzs egyetlen SmaI helyet tartalmaz egy nyitott leolvasási keretben (A51R), amely a vírus sejtenyésztésben való replikációjához nem esszenciális (Goebel és munkatársai, 1990). Noha ez a hely alkalmas idegen gén inszerciójára, a jelen példában azonban ezt a helyet töröltük annak érdekében, hogy egy többszörös klónozóhely kazettarészeként egy új, egyetlen SmaI hely bevezetésével sokoldalúbb vacciniavírusvektort állítsunk elő.

A fentieknek megfelelően 1  $\mu$ g vdN vírus-DNS-t SmaI-gyel hasítunk, és a HindIII restrikciós nukleáz felismerőszekvenciáját (odS1, 5'-AAGCTT-3') tartalmazó hexamer linker feleslegével ligáljuk. Ezen linker inszerciója a vacciniavírus SmaI hasítási helyére szétrombolja az SmaI felismerőszekvenciát, és egy új, HindIII felismerőszekvencia kialakulását eredményezi. A ligált anyagot szárnypoxvírussal fertőzött CV-1 sejtekbe való transzfekcióval pakoljuk a 7. példában leírtak szerint.

A vacciniavírus (WR-törzs) egyetlen SmaI helyét a 4.1 ábra C részében ismertetett eljárással is törölhetjük oly módon, hogy a vacciniavírus-DNS klónozott fragmensét módosítjuk ahelyett, hogy a teljes vacciniavírus-DNS-t közvetlenül módosítanánk. Első lépésben a vacciniavírus-DNS-t Sall-gyel hasítjuk, a Sall F-fragmenst izoláljuk alacsony olvadáspontú agarózból, és egy megfelelő plazmid, például a pTZ9R (Pharmacia,

Inc.) Sall helyére klónozzuk. A kapott pTZ-Sall plazmid két SmaI helyet tartalmaz, amelyek közül az egyik a többszörös klónozóhelyen van, és a másik a vacciniaszekvenciában (4.1 ábra C része). A pTZ-Sall-et részlegesen emésztjük SmaI-gyel, és I-SceI linkereket adunk hozzá az alábbiak szerint: első szál, I-SceI 1. linker (25. azonosítási számú szekvencia) és ennek komplementer szála az I-SceI 2. linker (26. azonosítási számú szekvencia). A helyes plazmidot – amelyben a vacciniaszekvenciából az SmaI helyet delécióval töröltük – SmaI-gyel és I-SceI-gyel való hasítással azonosítjuk. A termékplazmidot, a pTZ-SallFds-t alkalmazzuk az SmaI deléció bevitelére vacciniavírus-genomba, reverz gpt-génszelekciót alkalmazva, amint azt az NotI hely deléciójára leírtuk, azzal az eltéréssel, hogy módosítandó előnyös vírusként az F12,5 izolátumot alkalmazzuk, amely egy olyan vírus, amelyben az egyetlen SmaI helyre egy gpt-génkazetta van beépítve (lásd a 3. példát).

Az I-SceI endonukleáz hasítási hely így kapott inszerciója közvetlen molekuláris klónozásra előnyös, mivel ez az élesztőből izolált enzim egy 18mer helyet ismer fel, ezért a statisztikus DNS-szekvenciákat rendkívül kis gyakorisággal hasítja. Így például az I-SceI az élesztőgenomot csak egyszer hasítja [Thierry, A., Perrin, A., Boyer, J., Fairhead, C., Dujon, B., Frey, B. és Schmitz, G., Nucleic Acids Res. 19, 189–190 (1991)]. Az I-SceI kereskedelmi forgalomban kapható (Boehringer, Inc.). Egy I-SceI hely bevezetése egy olyan vektorba, amelyben azt megelőzően nincsen ilyen hely, olyan új vektort eredményez, amelyben van egy géninszercióra alkalmas egyedi hasítási hely. Azt, hogy egy vacciniavírus-DNS vagy más vektor-DNS tartalmaz-e egy I-SceI hasítási helyet, a vektor-DNS szokásos restrikciós analizisével határozhatjuk meg.

Ha az SmaI hely vacciniavírus-DNS-ből való törlésére ezt a második eljárást alkalmazzuk, a vdTK vektor szerkesztésének műveleti sorrendje az alábbi: vdS vírus előállítás az SmaI hely deléciójával (lásd fent); NotI hely deléciója az NotI gpt-génkazetta inszerciójával (lásd az 1. példát) a vdS egyetlen NotI helyére való klónozással és pakolás, az így kapott vdSngpt vírus reverz gpt-szelekciója a fent ismertetett módon, vdSngpt és pTZ-SallFds mint szubsztát alkalmazásával a marker mentési kísérletben; és a tk-gén deléciója, amint azt a jelen példában alább ismertetjük.

A vdTK vektort valójában egy másik módszerrel is előállítottuk, amelyet az alábbiakban ismertetünk. A vad típusú vacciniavírus SmaI helyének deléciójával előállítottuk a köztes vdS vírust. Egy második kísérletben vad típusú vacciniavírusból töröltük az NotI helyet, és így előállítottuk a köztitermék vdN vírust. A CV-1 sejteket mindkét vírussal együtt fertőzve, és a rekombináns vírust PCR-módszerrel szűrve kaptuk a vdSN vírust (ezt a vírust egyetlen genetikus keresztezési esemény eredményeként kaptuk). A különböző köztitermékek életképességét titrálassal határoztuk meg.

A vdN klónozáskísérletből kapott egyes izolátumokat ötször plaktisztítottuk (ezáltal biztosítottuk a kapott klónok vad típusú vírustól való mentességét), majd elsza-

porítottuk, az eredményeket a 4.1 táblázat A része mutatja. Titrálás után az első elszaporítással nyert nyersvírus törzsszuspenziókat a vad típusú kontrollal (WR–WT) együtt alkalmaztuk CV–1-sejtek fertőzésére 0,1 pfu/sejt mennyiségben. Ezeket a sejteket 48 óra múlva összegyűjtöttük, és az így nyert nyers törzsszuspenziókat újratitáltuk. Ezeket az eredményeket a 4.1 táblázat B része tartalmazza. A vdN/A1 6.1111 és vdN/A1 10.1111 izolátumokat vdN6, illetve vdN10 klónnak neveztük, és ezeket alkalmaztuk nagy léptékű vírusenyésztéshez.

#### 4.1 táblázat

vdN vírus köztitermékek életképességének vizsgálata

A) 6 vdN vírusizolátum titere első szaporítás után (pfu/ml nyers törzstenyészet)

|        |         |                          |
|--------|---------|--------------------------|
| vdN/A1 | 2.1111  | $1,0 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 4.1111  | $1,3 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 6.1111  | $9,0 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 8.1111  | $8,0 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 10.1111 | $4,0 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 12.1111 | $1,1 \times 10^8$ pfu/ml |

B) Titer a második szaporítás után

|        |         |                          |
|--------|---------|--------------------------|
| vdN/A1 | 2.1111  | $3,6 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 4.1111  | $2,5 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 6.1111  | $5,9 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 8.1111  | $4,2 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 10.1111 | $4,3 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdN/A1 | 12.1111 | $2,2 \times 10^8$ pfu/ml |

WR–WT  $5,4 \times 10^8$  pfu/ml

A vdS klónozkísérletből nyert egyes izolátumokat ötször plakktisztítottuk, majd szaporítottuk és titráltuk, az eredményeket a 4.2 táblázat A része mutatja. Az első szaporítással kapott nyerstenyészeteiket a vad típusú kontrollal (WR–WT) együtt alkalmaztuk CV–1-sejtek fertőzésére 0,1 pfu/sejt mennyiségben. A sejteket 48 óra múlva összegyűjtjük, és a kapott nyerstenyészeteiket újratitáljuk. Ezek az eredmények a 4.2 táblázat B részében láthatók. A vdS 7.11 izolátumot vdS2, illetve vdS7 klónnak neveztük, és ezeket alkalmaztuk a nagy léptékű víruspreparátumok előállítására. Minden esetben a legjobb szaporodási tulajdonságokat mutató vírusizolátumot választottuk ki a szaporításra és a nagy léptékű tenyésztésre.

#### 4.2 táblázat

vdS vírus köztitermékek életképességének vizsgálata

A) 5 vdS vírusizolátum titere első szaporítás után (pfu/ml nyers törzstenyészet)

|     |      |                          |
|-----|------|--------------------------|
| vdS | 2.11 | $4,1 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdS | 3.11 | $6,5 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdS | 4.11 | $8,0 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdS | 5.11 | $2,7 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdS | 7.11 | $4,7 \times 10^7$ pfu/ml |

B) Titer a második szaporítás után

|     |      |                          |
|-----|------|--------------------------|
| vdS | 2.11 | $1,6 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdS | 3.11 | $1,4 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdS | 4.11 | $8,0 \times 10^7$ pfu/ml |
| vdS | 5.11 | $1,3 \times 10^8$ pfu/ml |
| vdS | 7.11 | $1,7 \times 10^8$ pfu/ml |

WR–WT  $2,8 \times 10^8$  pfu/ml

#### SmaI hely deléciót tartalmazó vírus (vdSN) azonosítása PCR szűréssel

Az SmaI hely deléciót tartalmazó vdSN vacciniavírus-klónokat az alábbiak szerint azonosítottuk PCR-szűrővizsgálattal.

A PCR-reakcióban első primerként az odS2 oligonukleotidot (27. azonosítási számú szekvencia), második primerként az odS3 oligonukleotidot (28. azonosítási számú szekvencia) alkalmaztuk. Az odS2 oligonukleotidszekvencia a vacciniavírus-genomban mintegy 340 bázispárral az SmaI hely előtt (3'-irányban) lokalizálódik, míg az odS3 oligonukleotidszekvencia mintegy 340 bázispárral ezen hely után (5'-irányban) helyezkedik el. Templátként egy vírusplakkal – a fentiekben a vdN azonosítására ismertetett módon – fertőzött CV–1-sejtek összes DNS-e szolgált. A mintegy 680 bp hosszúságú PCR-rel felerősített sáv SmaI-lyel szembeni érzékenységét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az SmaI hasítással szemben ellenálló, jelezvén a HindIII vagy I–SceI linker inszercióját, míg a vad típusú kontroll-DNS két, mintegy 340 bp hosszúságú darabra hasítódik. A kívánt linkert az SmaI helyen inzertálva tartalmazó egyik vacciniavírust vdSN-nek nevezzük.

#### Timidin-kináz-gén kódoló régiójának deléciója vdSN vacciniavírusból

A vdSN vacciniavírusból egy új vektor törzset (neve vdTK) állítottunk elő azáltal, hogy a vacciniagenom genetikusan stabil régiójában lokalizálódó timidin-kináz (tk) gént egy több egyedi restriktációs endonukleáz hasítási helyet tartalmazó szegmenssel helyettesítettük (4.1A ábra).

A timidin-kináz (tk) kódoló szekvenciát töröljük először a tk-gént tartalmazó vacciniagenom-szegmenst (HindIII J szegmens) magában foglaló plazmidből (pHindJ–1) (lásd a 4.2 ábrát). A tk-gén helyére ezután egy többszörös klónozóhelyet inzertálunk, amely egyetlen NotI, SmaI, ApaI és RsrII helyet tartalmaz SfiI helyekkel határolva. Végül a módosított vírusszegmenst vdSN vacciniavírus-genomba visszük be, amelyet ezután vdTK-nak nevezünk (4.1A ábra). A kényszerített klónozás további elősegítésére a vektorban a két SfiI hely mindegyikét egyedivé tesszük, az SfiI felismerőszekvencia (GGCCNNNN'NGGCC) variálható természetét felhasználva. A két SfiI hely szekvenciája az alábbi: SfiI(1), GGCCGGCT'AGGCC (29. azonosítási számú szekvencia), és SfiI(2), GGCCATAT'AGGCC (30. azonosítási számú szekvencia). A tk-gén végső módosítását tartalmazó ezen plazmidot (pHindJ–3) a pHindJ–1 prekursor plazmidból szerkesztjük meg „loop-out” mutagenézissel, és a tk-gén delécióját szekvenciaanalízissel igazoljuk.

#### Prekursor pHindJ–1 plazmid szerkesztése

Vad típusú vacciniavírus-DNS-t HindIII-mal hasítottunk, és a kapott fragmenseket 0,8%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben szétválasztjuk. A HindIII fragmenst UV fény alatt kivágjuk, és ismert módszerekkel kipreparáljuk. A fragmenst a pTZ19R plazmid (Pharmacia, Inc.) egyetlen HindIII helyére inzertálva kapjuk a pHindJ–1 plazmidot.

### *pHindJ-2 plazmid szerkesztése*

A pHindJ-1 plazmidot *E. coli* NM522 törzsbe transzfektáljuk, és az egyszálú DNS-t helper M13K07 fággal a Pharmacia használati útmutatója szerint felülfertőzve állítjuk elő. Az egyszálú DNS szolgál templátként a primer odTK1-gyel (31. azonosítási számú szekvencia) végzett helyirányított mutagenézishez. Ez a primer a promotor régióval és a tk-gén translációs stopkodonja körüli régióval komplementer. Központi részében egyedi BamHI, HpaI, NruI és EcoRI restrikciós helyeket tartalmaz. A mutagenézis eljárást az Amersham, Inc. által gyártott mutagenézis készlettel hajtjuk végre a gyártó előírásai szerint.

A pHindJ-2 szerkesztéséhez a tk-gén-szekvenciát Weir J. P. és Moss B. írta le [J. Virol. 45, 530–537 (1983)]. A tk-gén-szekvencia az EMBL Adatbankjában hozzáférhető PVHINLJ azonosító (ID) alatt. A plazmid vektorrészének (pTZ19R) szekvenciája a Pharmacia, Inc.-től beszerezhető. A delécióval törölt vacciniavírus timidin-kináz (tk)-gén körüli szekvencia a pHindJ-2 plazmidban a 4. azonosítási számú szekvenciának felel meg. A tk-gén 5'-regióját (szekvencialistánkban az 1–19. bázisok; az ID PVHINLJ-ben a 4543–4561. bázisok) követik a BamHI, HpaI, NruI és EcoRI egyedi hasítási helyek és a tk-gén 3'-regiója (jelen szekvencialistánkban a 44–67. bázisok; az ID PVHINLJ-ben az 5119–5142. bázisok). Az ID PVHINLJ szerinti 4562–5118. bázisokat – amely szekvencia a tk promotor egy részét és a tk-gén kódolórégiót tartalmazza – a pHindJ-2 plazmidból delécióval töröltük.

### *pHindJ-3 plazmid szerkesztése*

A pHindJ-2 plazmidot BamHI-gyel és EcoRI-gyel emésztjük, és inzertáljuk az SfiI helyekkel határolt, egyedi NotI, SmaI, RsrII és ApaI restrikciós helyeket tartalmazó kettős szálú linkert. A linker a P-J(1) (32. azonosítási számú szekvencia) és P-J(2) (33. azonosítási számú szekvencia) oligonukleotidokból áll.

A pHindJ-3 módosított szekvenciája az 5. azonosítási számú szekvenciának felel meg. Az inzertált többszörös klónozóhely a P-J(1) oligonukleotidnak felel meg. Az inzertált szekvencia a 21-es helyzeten kezdődik, és a 99-es helyzetben ér véget. A határolószekvenciák azonosak a pHindJ-2-ben ismertettekkel.

A tk-deléció vacciniavírusba való inzertálására a pHindJ-3 plazmidot HindIII-mal emésztjük, és a tk-gén-deléciót tartalmazó, megrövidített HindIII J fragmenst alkalmazzuk egy marker mentési kísérletben Sam és Dumbell (1981) módszere szerint. A tk-gén-delécióval rendelkező vírusokat tk-negatív szelekcióval izoláljuk (Mackett és munkatársai, 1982), majd ezt követően PCR szűréssel azonosítjuk.

Közelebbről a pHindJ-3-ban jelen lévő módosított HindIII fragmenst HindIII-mal kivágjuk, és alacsony olvadáspontú agarózgélen izoláljuk. A markermentést lényegében Sam és Dumbell által leírt módon (1981) végezzük az alábbi módosításokkal.  $5 \times 10^6$  CV-1-sejtet fertőztünk 0,2 pfu/sejt vdSN vacciniavirussal. 1 órán át tartó inkubálás után a fertőzött sejtekbe 1 ml kalcium-foszfátos precipitátumot transzfektáltunk, amely 1  $\mu$ g módosított HindIII fragmenst tartalmaz. 2 napos szapo-

ritás után egy nyersvírus törzstenyészetet kapunk az 1. példában ismertetett módon, és humán 143B tk-negatív sejteken titráljuk bróm-dezoxi-uridin (BrdU) jelenlétében Mackett és munkatársai (1982) módszere szerint. A tk-negatív plakkokat PCR szűrővizsgálattal tovább analizálhatjuk.

### *Timidin-kináz deléciós vírus (vdTR) azonosítása PCR-szűrővizsgálattal*

A PCR-reakcióban első primerként az odTK2 oligonukleotidot (34. azonosítási számú szekvencia) használtuk, amelynek a szekvenciája a tk-gén előtt mintegy 300 bp-vel helyezkedik el. A második primer az odTK3 (35. azonosítási számú szekvencia), amely a tk-gén stopkodonja után mintegy 220 bázispárral helyezkedik el. A templát az egy vírusplakkal fertőzött CV-1-sejtek teljes DNS-e, a vdN szűrővizsgálatára leírtak szerint. A tk-gén-delécióval rendelkező vírus sokszorozásával kapott termék mintegy 520 bp hosszúságú, míg a vad típusú kontrollal egy mintegy 1,1 kb hosszúságú fragmens keletkezik.

### *A vdTR vektor átvitelére alkalmas génexpressziós kazettákat tartalmazó plazmidok szerkesztése*

A kiindulási plazmid a pAO plazmid, amely a vdTK vacciniavírus-vektor mesterklónozóhelyének egyedi helyeiből álló mesterklónozóhelyet tartalmazza. A pAO plazmidot úgy konstruáltuk, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható plazmid többszörös klónozóhelyét egy olyan szegmenssel helyettesítettük, amely a vdTK vektor egyedi helyeit és egy XhoI helyet tartalmaz, amint azt a 4.3 ábra mutatja.

Közelebbről a pBluescript II SK fragmid (Stratagene) többszörös klónozóhelyének deléciója céljából a plazmidot SacI-gyel és Asp718-cal emésztjük. A nagy vektorfragmenst egy adapterral ligáljuk, amely az összeillesztett P-A(0.1) oligonukleotidból (36. azonosítási számú szekvencia) és a P-A(0.2) oligonukleotidból (37. azonosítási számú szekvencia) áll.

A pAO többszörös klónozóhelye – amely a P-A(0.1) oligonukleotidnak felel meg – és a pBluescript II SK 5'- és 3'-határolórégióinak 20 bázisa a 6. azonosítási számú szekvenciában látható. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és a 95-ös helyzetben fejeződik be. (Az első A-maradék az 5'-végen a 2187-es helyzetű bázisnak felel meg, és az utolsó G-maradék a 3'-végen a 2301-es helyzetű bázisnak felel meg a pAO plazmidban.)

### *pA1 és pA2 plazmidok szerkesztése*

A pA1 és pA2 plazmidokat DNS-szegmensek, például szintetikus vagy természetes promotor fragmensek inszerciójához terveztük. Ezeket úgy állítottuk elő, hogy a pAO XhoI helyére egy linkert inzertáltunk, amely olyan gyakori hasító enzimek második többszörös klónozóhelyét tartalmazza, amelyek a pAO-t nem hasítják. Mind a két plazmid szerkezete azonos, kivéve a második klónozóhely orientációját (lásd a 4.3 ábrát).

A pAO plazmidot XhoI-gyel emésztjük, és egy adapterral ligáljuk, amely az összeillesztett P-A(1.1) és P-A(1.2) oligonukleotidokból áll. Az adaptert mindkét lehetséges orientációban tartalmazó plazmidokat izoláltuk, és pA1-nek, illetve pA2-nek neveztük.

A pA1 többszörös klónozóhelyét – amely a P–A(1.1) oligonukleotidnak felel meg – és a pAO 3'- és 5'-határolórégióinak 20 bázisát a 7. azonosítási számú szekvencia mutatja. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és 83-as helyzetben ér véget. (Az első C-maradék az 5'-végen a 2222-es helyzetnek felel meg, és az utolsó C-maradék a 3'-végen 2324-es helyzetű maradéknak felel meg a pA1 plazmidban.)

A pA2 többszörös klónozóhelyét – amely a P–A(1.2) oligonukleotidnak felel meg – és a pA2 5'- és 3'-végeinek 20 bázisát a 10. azonosítási számú szekvencia mutatja. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és a 195-ös helyzetben ér véget. (Az 5'-végen az első C-maradék a 2252-es helyzetnek felel meg, és a 3'-végen az utolsó génmaradék a 2466-os helyzetnek felel meg a pA2–S1 plazmidban.)

#### *pA1–S1 és pA2–S1 plazmidok szerkesztése*

A pA1–S1 és pA2–S1 plazmidok az S1 erős szintetikus poxvirus promoterral rendelkeznek, amely egy transzlációs startkodont tartalmaz, ezt egy egyetlen EcoRI hely követi, amely alkalmas kapcsolódó startkodonnal nem rendelkező nyílt leolvasási keretek inzertálására. Az S1 promotor a P2-nek nevezett, erős poxvirus késői promoternek egy módosított változata.

A pA1–S1 és pA2–S1 plazmidokat úgy állítjuk elő, hogy egy első kettős szálú promoter fragmenst inzertálunk a pA1 vagy pA2 NdeI és BamHI helyére kényszerített klónozással (4.4 ábra A része). Közelebről a pA1 vektort NdeI-gyel és BamHI-gyel emésztjük, és egy adapterrel ligáljuk, amely az összeillesztett P–P2m1.1 és P–P2m1.2 oligonukleotidokból áll. A kapott plazmidot pA1–S1-nek nevezzük.

A pA1–S1 szintetikus promoterszekvenciát (amely a P–P2m1.1 oligonukleotidnak felel meg) és a pA1 5'- és 3'-határolórégióinak 20 bázisát a 9. azonosítási számú szekvencia mutatja. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és a 193-as helyzetben ér véget. (Az első C-maradék az 5'-végen a 2228-as helyzetnek felel meg, és az utolsó G-maradék a 3'-végen a 2440-es helyzetnek felel meg a pA1–S1 plazmidban.)

A pA2 vektort NdeI-gyel és BamHI-gyel emésztjük, és egy adapterrel ligáljuk, amely az illesztett P–P2m1.1 és P–P2m1.2 oligonukleotidokból áll, ahogy azt a pA1–S1-re fent említettük. A kapott plazmidot pA2–S1-nek nevezzük.

A pA2–S1 szintetikus promoterszekvencia (amely a P–P2m1.2 oligonukleotidnak felel meg) és a pA2 5'- és 3'-határolórégióinak 20 bázisát a 10. azonosítási számú szekvenciában látható. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és a 195-ös helyzetben ér véget. (Az első C-maradék az 5'-végen a 2252-es helyzetnek felel meg és az utolsó G-maradék a 3'-végen a 2466-os helyzetnek felel meg a pA2–S1 plazmidban.)

#### *pA1–S2 és pA2–S2 plazmidok szerkesztése*

A pA1–S2 és pA2–S2 plazmidok az S2 erős szintetikus promotert – a Davison és Moss által leírt [J. Mol. Biol. 210, 771–784 (1989)] erős késői szintetikus poxvirus promotor egy módosított változatát – tartalmazák. Ezek a plazmidok nem tartalmaznak transzlációs startkodont a promoterral kapcsolva, és ezért alkalma-

sak startkodont tartalmazó, teljes, nyílt leolvasási keretek inzertálására. A promoterek különböző orientációban vannak a vdTK mesterklónozóhelyhez viszonyítva ebben a két plazmidban.

A pA1–S2 és pA2–S2 plazmidokat egy második kettős szálú promotor fragmensnek a pA1, illetve pA2 plazmid HpaI és EcoRI helyére való kényszerített klónozásával állítjuk elő (4.5 ábra A része). Közelebről, az pA1 plazmidot HpaI és EcoRI enzimekkel emésztjük, és az illesztett P–artP(5) és P–artP(6) oligonukleotidokból álló szintetikus linker szekvenciával ligáljuk. A kapott plazmidot pA1–S2-nek nevezzük.

pA1–S2 szintetikus promoterszekvencia – amely a P–artP(5) oligonukleotidnak felel meg – és a pA1 5'- és 3'-határolórégióinak 20 bázisa a 11. azonosítási számú szekvencián látható. Az inzertált szekvencia a 21-es helyzetben kezdődik és a 68-as helyzetben ér véget. (Az 5'-végen az első T-maradék a 2240-es helyzetnek felel meg és a 3'-végen az utolsó A-maradék a 2327-es helyzetnek felel meg a pA1–S2 plazmidban.)

Hasonlóképpen a pA2 plazmidot HpaI és EcoRI enzimmel emésztjük, és az illesztett P–artP(5) és P–artP(6) oligonukleotidokkal ligáljuk a pA1–S2-höz hasonló módon. A kapott plazmidot pA2–S2-nek nevezzük. A pA2–S2 szintetikus promoterszekvencia – amely a P–artP(6) oligonukleotidnak felel meg, és a pA2 5'- és 3'-határolórégióinak 20 bázisa a 12. azonosítási számú szekvencián látható. Az inzert a 21-es helyzetben kezdődik és 72-es helyzetben ér véget. (Az 5'-végen az első T-maradék a 2263-as helyzetnek, a 3'-végen az utolsó A-maradék a 2354-es helyzetnek felel meg a pA2–S2 plazmidban.)

A pA1–S1, a pA2–S1, pA1–S2 vagy pA2–S2 plazmidok bármelyikébe egy nyitott leolvasási kerettel inzertálható, majd ezt követően az expressziós kazetta kivágható, és a vdTK vírusvektor megfelelő helyeire inzertálható irányított klónozással. A kazettát az alkalmazott klónozó plazmidtól függően bármelyik orientációban inzertálhatjuk a vírusgenomba.

#### *Szelektív markerrel rendelkező expressziós kazettákat tartalmazó plazmidok szerkesztése (pN2gpt–S3A és pN2gpt–s4)*

A kényszerített klónozásra tervezett plazmidokon kívül két további plazmidot is szerkesztettünk gének bevitelére egy poxvirusvektor egyetlen NotI helyére, egy E. coli gpt szelektáló markergén segítségével. Ezek két további poxvirus promotert is szolgáltatnak a fent ismertetett S1 és S2 promotereken kívül. A pN2gpt–S3A plazmidot (4.7 ábra) olyan nyitott leolvasási keretek inzertálására alkalmazhatjuk, amelyek nem rendelkeznek iniciátorkodonnal. A vacciniavírusba beviendő géneket (a gpt-markert és a nyitott leolvasási keretet) vagy magával az NotI-gyel, vagy két enzimmel, például NotI-gyel és SmaI-gyel (vagy RsrII-vel és ApaI-gyel) vághatjuk ki. A kivágott fragmenst ezután a vdTK vírusvektor megfelelő helyére (vagy helyeire) inzertálhatjuk.

A pN2gpt–S4 plazmidot (4.7 ábra) egy AUG transzlációs startkodont is tartalmazó teljes nyitott leolvasási keretek inzertálására alkalmazhatjuk. A gpt-markergént

és a nyitott leolvasási keretet tartalmazó kazettákat a pN2gpt-S3A-ra fent ismertetett módon vágjuk ki. Az S3A és S4 promoterek az erős poxvírus késői promoterek módosított változatai.

Az előbbi plazmidokat úgy szerkesztjük meg, hogy először előállítjuk a pN2-gpta és pN2-gptb plazmidokat (4.6 ábra), amelyek egy *E. coli* gpt-gént tartalmaznak a P7,5 vacciniavírus promoter szabályozása alatt, és ezeket egyedi restriktációs helyek – beleértve az NotI-et is – határolják (1.3 ábra). Az S3A vagy S4 promoter fragmenszertálása a pN2-gptb plazmid egyetlen PstI és ClaI helyeire eredményezi a pN2-gpt-S3A és pN2gpt-S4 plazmidokat.

#### pN2-gpta és pN2-gptb plazmidok szerkesztése

Az előbbi plazmidok szerkesztését az 1. példában és a 4.6 ábrán ismertetjük.

#### pN2gpt-S3A plazmid szerkesztése

A kiindulási pN2-gptb plazmidot PstI-vel és ClaI-vel emésztjük, és a P-artP(7) és P-artP(8) oligonukleotidokból álló szintetikus linkerszekvenciával (40. azonosítási számú szekvencia) ligáljuk. A kapott plazmidot pN2gpt-S3A-nak nevezzük.

A pN2gpt-S3A szintetikus promoterszekvencia – amely a P-artP(7) oligonukleotidnak felel meg – és a pN2-gptb 5'- és 3'-határoló régióinak 20 bázisa látható a 13. azonosítási számú szekvenciában. Az inzertált DNS-szekvencia a 21-es helyzetben kezdődik, és a 107-es helyzetben ér véget. (Az 5'-végen az első T-maradék 3328-as helyzetnek, a 3'-végen az utolsó A-maradék a 3454-es helyzetnek felel meg a pN2gpt-S3A plazmidban.)

#### pN2gpt-S4 plazmid szerkesztése

A pN2gptb plazmidot PstI-vel és ClaI-vel emésztjük, és a P-artP(9) és P-artP(10) oligonukleotidokból álló adapter szekvenciával (41. azonosítási számú szekvencia) ligáljuk. A kapott plazmidot pN2gpt-S4-nek nevezzük. A pN2gpt-S4 szintetikus promoterszekvencia – amely a P-artP(9) oligonukleotidnak felel meg – és a pN2-gptb 5'- és 3'-határoló régióinak 20 bázisa a 14. azonosítási számú szekvenciában látható. Az inzertált DNS-szekvencia a 21-es helyzetben kezdődik és a 114-es helyzetben végződik. (Az 5'-végen az első T-maradék a 3328-as helyzetnek, a 3'-végen az utolsó A-maradék a 3461-es helyzetnek felel meg a pN2gpt-S4 plazmidban.)

#### 5. példa

#### Polipeptidok expressziója vacciniavírus-vektorban (vdTK) génexpressziós kazetták közvetlen molekuláris inszerciójával

Ebben a példában mutatjuk be azt a lehetőséget, hogy hogyan lehet egy találmány szerinti vacciniavírus-vektorba (vdTK) klónozott géneket inzertálni poxvírus expressziós szerkezetek gyors előállítása céljából a 4. példában ismertetett génexpressziós kazetták közvetlen molekuláris inszerciójával. Ebben a példában ismertetjük a vdTK vektorkazetta-rendszer alkalmazását olyan szerkezetek előállítására, amelyek képesek különféle modellpeptideket – például a humán vérproteineket (protrombin és plazminogén variánsait) és egy humán vírusantigént (HIV-gp160-at) expresszálni.

#### Humán protrombint expresszáló módosított vacciniavírus (vPTI) szerkesztése

A humán protrombin (PT) modellként szolgál idegen proteinek expressziójára a találmány szerinti vacciniavírus-vektorban. Korábban kimutatták, hogy a protrombint kódoló cDNS expresszálnak egy hagyományosan konstruált rekombináns vacciniavírus által (lásd PCT/EP91/00139 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés, Falkner és munkatársai, amelynek tartalmát referenciaként beépítettük a leírásba).

A módosított protrombin cDNS-t 2,0 kb hosszúságú EcoRI fragmenseként vágjuk ki a pTKgpt-PTHBb plazmidból és a pA1-S1 plazmid (4. példa, 4.4 ábra) egyetlen EcoRI helyére inzertáljuk, amelynek eredményeképpen kapjuk a pA1S1-PT plazmidot (5.1 ábra). A fenti plazmid expressziós kazettájában a protrombin cDNS az S1 szintetikus poxvírus S1 promoter szabályozása alatt áll, amely transzlációs iniciátorkodot is biztosít.

A humán protrombin szekvenciáját Degen S. J. F., MacGillivray R. T. A. és Davie, E. publikálta [Biochemistry 22, 2087–2097 (1983)]. Ez a szekvencia az EMBO Adatbankban hozzáférhető HSTHR1 azonosítási számon. Az ID HSTHR1 szekvencia nem teljes, hiányzik belőle a protrombin kódoló régiójának első 19 bázispárja. Mi szekvenáltuk az ID HSTHR1 cDNS-éből hiányzó fenti részt, és az alábbiakban ismertetjük.

A több módosítás és báziscsere miatt a jelen humán protrombin cDNS-klón teljes szekvenciáját közöljük a 15. azonosítási számú szekvenciában, beleértve az S1 promotert és a határoló plazmidsekvenciák 20 bázisát is.

A Falkner-féle bejelentésben (PCT/EP-91/00139) ismertetett műveletek szerint a cDNS-t az alábbiak szerint módosították: két további kodont (22–27-es helyzetű bázisok) vezettek be, amely két új aminosav beépülését eredményezi; a 3'-nem transzlált szekvenciát egy EcoRI hely bevezetésével eltávolították; az 1963–1965-ös helyzetű bázisokat (az ID HSTHR1 szekvenciában az 1920–1922-es helyzetű bázisok) TGG-ről GAA-ra cserélték helyirányított mutagenézissel.

A jelen PT cDNS-ben egy bázispárcserét találtunk, amely egy új NcoI helyet eredményez: az 525-ös helyzetű bázis (ID HSTHR1-ben 482-es helyzetű bázis) cserélődik C-ről A-ra. Ez egy csendes mutáció, mivel a CCC kodon (Pro) cserélődik CCA kodonra (Pro), amelynek eredményeként egy új NcoI hely jön létre. (A 15. azonosítási számú szekvencia első bázisa a pA1S1-PT-ből a 2394-es helyzetű bázisnak felel meg, és az utolsó bázis a pA1S1-PT plazmid teljes szekvenciájában a 4381-es helyzetű bázisnak.)

A vdTK vacciniavírus-vektorba való transzferhez a pA1S1-PT plazmidból NotI és RsrII endonukleázokkal vágjuk ki a kazettát, és alacsony olvadáspontú agarózgélben való elválasztás után izoláljuk. A vdTK vírusvektor-DNS-t NotI-vel és RsrII-vel hasítjuk, fenollal extraháljuk, és etanollal kicsapjuk. A vektor-DNS többszörös klónozóhelyének kis NotI-RsrII kapcsoló fragmense elvész az etanolos kicsapási lépésben. A vacciniavektor-karokat 20-szoros mólófeleslegben lévő kazet-

tával ligáljuk. A ligált vacciniavírus-DNS pakolását helper-származékos vírussal csirkesejtekben a 3. példában ismertetjük. A CV-1 sejtek fertőzésével előállított plakkokból származó pakolt vírusokat újra plakk tisztításnak vetjük alá, és kis mennyiségű nyers törzstenyészeteket készítünk. A vírusizolátumokat tovább analizálhatjuk Southern-blot-analízissel és expressziós analízissel a Falkner bejelentésben leírtak szerint. A protrombin cDNS inszerciójára korrekt genomiális szerkezettel rendelkező vírusizolátumot vPT1-nek jelöljük. Egy hasonló rekombináns vacciniavírus – amelyet markermentéssel állítottak elő – Vero-sejtekben mintegy 50–60 milliegyeség/ml sejtenyészet-felülűző aktivitással indukálja a protrombin expresszióját (lásd a Falkner bejelentést).

#### *Humán glu-plazminogén expresszáló vacciniavírus (vGPg1) szerkesztése*

A plazminogén (Pg) natív formája egy glutamin aminosavval kezdődő aminoterminálist tartalmaz, ezért glu-plazminogénnek (glu-Pg) is nevezik. A plazminogén egy részlegesen átalakított formájából hiányzik az első 77 aminoterminális aminosav (az aktivációs peptid), ezt lys-plazminogénnek (lys-Pg) nevezik. A lys-Pg affinitása a szubsztatrifibrinnel szemben sokkal nagyobb, mint a glu-Pg-é. Ezenkívül a rekombináns lys-Pg sokkal stabilabb, mint a glu-Pg gént hordozó (hagyományos) vaccinia rekombinánsal fertőzött sejtenyészetek felülűzőjában.

A teljes humán plazminogén cDNS-t (amely transzlációs start- és stopkodonokat is tartalmaz) kivágjuk a plazmidból (phPlas-6) Ball-Smal fragmensként. A humán plazminogén szekvenciáját Forsgren M., Raden B., Israelsson M., Larsson K. és Heden L.-O. publikálta [FEBS Letters 213, 254–260 (1987)] és az EMBO Adatbankban (Génbank) HSPMGR azonosítási számon (ID) hozzáférhető. Ezért ennek a plazmidnak a szekvenciáit nem közöltük a jelen bejelentés szekvencialistájában, mivel ez a plazmid nem az egyetlen forrása a plazminogén DNS-szekvenciának. Azonban a jelen plazminogén szekvencia kódoló régiója legalább egy nukleotidban különbözik a publikált szekvenciától: a 112-es helyzetű A-maradék (ID HSPMGR) egy G-maradékkra változik a jelen DNS-ben, ami egy aminosavszubsztitúciót (Lys → Glu) eredményez.

A plazminogén cDNS-t a pN2gpt-S4 plazmid (4. példa, 4.7 ábra) HpaI helyére inzertáljuk. Ezt a plazmidot azért választottuk egy szelektálomarkert tartalmazó génexpressziós kazetta szerkesztésére, mert a plazminogén cDNS két ApaI helyet és egy RsrII helyet tartalmaz, és ezért nem engedi meg a kényszerített klónozásra tervezett expressziós kazetták alkalmazását. A kapott plazmidot pN2gpt-GPg-nek nevezzük (5.2 ábra).

A pN2gpt-GPg-re megadott 17. azonosítási számú szekvenciában látható a plazminogén iniciátor kodonját is tartalmazó S4 promotor csatlakozó régiója (jelen szekvenciában a 32-es helyzetű bázis; az ID HSPMGR-ben az 55-ös helyzetű bázis). A glu-plazminogén kódoló régióját nem közöljük a szekvencialistában. A szekvencia a stopkodonnal folytatódik (a jelen szekvenciában a 35-ös helyzetű bázis; ID HSPMGR-ben a 2485-ös hely-

zetű bázis) és a 3'-nem transzlált plazminogén szekvencia 25 bázisával folytatódik. Ezt a szekvenciát követi a phPlas6 többszörös klónozóhelyének 29 bázisa és a pN2gpt-S4 plazmid többszörös klónozóhelyének 20 bázisa.

A glu-plazminogén génkazetta vacciniavírus-genomba való transzferjéhez a két gént és azok promotereit (a gpt-szelekciós markert szabályozó P7,5 promotert és a glu-plazminogén gént szabályozó S4 promotert) tartalmazó pN2gpt-GPg NotI fragmensét alacsony olvadáspontú agarózgélben izoláltuk és tisztítottuk. Ezt a kazettát ligáltuk az NotI-gyel hasított vdTK vacciniavírus-DNS karjaihoz. A pakolást és a plakk tisztítást a 3. példában írjuk le. Az inzertált plazminogén génkazettára helyes szerkezettel rendelkező vírust vN2gpt-GPg-nek nevezzük. Ezt a vírust használjuk plazminogén expressziójára CV-1-sejtekben, a markermentési módszerrel szerkesztett analóg vacciniavírusra ismertetett módon. A sejtenyészet felülűzőjában a szekretált glu-Pg koncentrációja mintegy 1,5 µg/10<sup>6</sup> sejt hagyományosan szerkesztett vacciniavírussal való fertőzés után 24 órával a vacciniavírus-vektorok idegen proteinek sejtenyészetben való expressziójára alkalmazott standard tenyésztési feltételek között. A glu-plazminogén a sejtenyészet felülűzőjában csak egy proteázinhibitor (50 µg/ml aprotinin) jelenlétében volt detektálható.

#### *Humán lys-plazminogén expresszáló vacciniavírus (vLPg1) szerkesztése*

Lys-plazminogén kódoló szekvenciát állítottunk elő a teljes plazminogén cDNS-ből az első 77 aminosavat (Glu1-től Lys77) kódoló 231 bp hosszúságú régió deléciójával (lásd az 5.3 ábrát). Ezt a szekvenciát egy szelektálható markergént (E. coli gpt) tartalmazó pN2gpt-S4 plazmid génexpressziós kazettájába inzertáltuk, így nyertük a pN2gpt-LPg-nek nevezett plazmidot (5.3 ábra).

Ebben a plazmidban a preszekvencia (a szekréciót mediáló szignálpeptidet kódoló szekvencia) közvetlenül kapcsolódik a plazminogénben lévő 78. helyzetben lévő lizinmaradékot kódoló első nukleotiddal. Az ezen fűzővel előállított új szignálpeptid hatásai hasonlóak sok ismert szignál hatásaihoz [lásd például von Heinje, Eur. J. Biochem. 133, 17–21 (1983)].

Ezenkívül a Pg cDNS-iniciátor kodonjának helyére egy új NcoI helyet vezettünk be, a pN2gpt-S4 plazmid egyetlen NcoI helyére való klónozás elősegítésére, és a promotor és a Pg-kódoló régió optimális kapcsolatának biztosítására. A Pg cDNS NcoI-gyel való kivágásának elősegítésére a két belső NcoI hely egyikét [NcoI(2); 5.3 ábra] az alábbiak szerint töröltük delécióval a Pg cDNS-ből.

A phPlas6 plazmidot E. coli NM522 törzsbe vittük, és egyszálú DNS-t állítottunk elő a helper M13KO7 fágval való felülfertőzéssel. A mutagenézis első ciklusát két oligonukleotiddal, az oNco1-gyel és az oNco2-vel végeztük, templátként az egyes szálú phPlas6 DNS-t alkalmazva, kereskedelmi forgalomban kapható mutagenézis készlettel (Amersham, Inc.). Az Nco1 oligonukleotid a plazminogén startkodonja előtti két A-mara-

déket két C-maradékká alakítja, ezzel egy NcoI hely alakul ki a startkodon környezetében, a plazminogén preszekvencia kódolórégiójának megváltoztatása nélkül. Az oNco2 oligonukleotid egy T-maradéket alakít C-maradékká a Pg cDNS belső NcoI helyén [NcoI(2)], ezáltal egy olyan csendes mutáció keletkezik, amely az NcoI helyet inaktíválja.

A plazminogén 1–77. aminosavait kódolórégiót delécióval töröltük a második „loop-out” mutagenesis lépéssel, egy 42 bázist tartalmazó oNco3 oligonukleotid alkalmazásával. Az összes mutációt szekvenálással és restrikciós analízissel megerősítettük.

A három mutációt tartalmazó pHLplas plazmidot SmaI-gyel linearizáltuk és NcoI-gyel részlegesen emésztettük. Izoláltuk a 2,2 kb hosszúságú NcoI–SmaI fragmenst és NcoI-gyel és SmaI-gyel hasított pN2gpt–S4 plazmidba inzertáltuk. A kapott plazmidot pN2gpt–LPg-nek nevezzük.

A pN2gpt–LPg-ben a plazminogén cDNS számos módosítása miatt a pLplas NcoI–SmaI fragmensének teljes szekvenciáját bemutatjuk, amely az S4 promotor 20 bázisát és a pN2gpt–S4 5'-irányú plazmid régiójának 20 bázisát is tartalmazza (18. azonosítási számú szekvencia). A plazminogén cDNS-szekvenciát az alábbiak szerint módosítottuk: a 19-es és 20-as helyzetben korábban jelen lévő két A-maradéket (ID HSPMGR-ben az 53-as és 54-es helyzetű bázisok) két C-maradékre cseréltük, amely NcoI helyet eredményezett; a szekvencialistában megadott szekvencia 21-es helyzetű bázisa (ID HSPMGR 55-ös helyzetű bázisa) a plazminogén startkodonjának A-maradéka; a 2220-as helyzetű bázis (ID HSPMGR-ben a 2485-ös helyzetű bázis) a stopkodon T-maradéka; az ID HSPMGR 111-es helyzetű bázisa (jelen szekvenciában a 77-es helyzetű bázis) az ID HSPMGR 343-as helyzetű bázisával kapcsolódik (jelen szekvenciában a 78-as helyzetű bázis), amely az aktivációs peptidet kódoló szekvencia delécióját eredményezi; a 926-os helyzetű T-maradéket (ID HSPMGR-ben az 1191-es helyzetű bázis) C-maradékre cseréltük (konzervatív csere), amely egy belső NcoI hely eltűnését eredményezi.

A lys-plazminogén génkazetta vacciniavírus-genomba való bevitelére a két promotor gén (a P7,5 promotor gpt-gén és az S4 promotor lys-plazminogén gén) kombinációját tartalmazó génexpressziós kazettát tartalmazó pN2gpt–LPg NotI fragmensét ligáljuk NotI-gyel hasított vdTK vacciniavírus vektor-DNS-sel, és a 7. példában leírtak szerint pakoljuk. Az inzertált génkazettára megfelelő szerkezetet tartalmazó egyik izolátumot – amelyet vN2gpt–LPg-nek nevezünk – használtuk a lys-plazminogén expressziójára CV–1-sejtekben olyan körülmények között, amelyeket korábban sejtenyésztésben proteinek termelése céljából hagyományosan megszerkesztett rekombináns vacciniavírus expressziós vektorok standard körülmények közötti tenyésztésére alkalmaztunk. A sejtenyésztés felülszójában a szekretált lys-Pg mennyisége mintegy 1,0–2,0 µg/10<sup>6</sup> sejt a hagyományos rekombinánsal való fertőzés után 24 órával. A lys-plazminogén a sejtenyésztés felülszójában tehát inhibitor hozzáadása nélkül is stabil.

#### *Humán immunhiányvírus glikoprotein 160 (HIV-gp160) expresszáására alkalmas vacciniavírus (vgp160–1) szerkesztése*

A HIV-gp160 komplett nyílt leolvasási keretét egy 2,5 kb hosszúságú EcoRV fragmensen kapjuk, amely egy M13 fág replikatív formájú (RF) DNS-éből kivágott DNS-t tartalmaz [mpPEenv; Fuerst és munkatársai, Mol. Cell. Biol. 7, 2538–2544 (1987)]. Ezt a fragmenst egy pN2gpt–S4 plazmidba inzertáljuk az 5.4 ábrán ismertetett módon. A kapott pN2gpt–gp160 plazmidban a gp160 gén az S4 szintetikus vacciniavírus promotor szabályozása alatt áll.

A HIV-gp160 szekvenciáját Ratner L. és munkatársai ismertették [Nature 313, 277–284 (1985)]. A BH8 klón szekvenciája az EMBO Adatbankban (Génbank) ID HIVH3BH8 néven hozzáférhető. Ezért a gp160 szekvenciát nem közöltük a 19. azonosítási számú szekvenciában, csak az S4 promotor kapcsolódó régióját és az egy gp160 gén iniciátorkodonját magában foglaló EcoRV HIV–gp160 fragmensét (28-as helyzetű bázis a jelen szekvencialistában közölt szekvenciában; 226-os helyzetű bázis az ID HIVH3BH8-ban). Az EcoRV HIV–gp160 fragmens az M13 fág (replikatív forma) mpPEenv-ből származik, amelyet Fuerst T. R., Earl P. és Moss B. ismertettek [Mol. Cell. Biol. 7, 2538–2544 (1987)]. A szekvencia a stopkodonnal (31-es helyzetű bázis a jelen szekvenciában; 2779-es számú bázis az ID HIVH3BH8-ban) és az EcoRV hely 5'-irányú részének egyik felével folytatódik. Ezt a szekvenciát a pN2gpt–S4 plazmid többszörös klónozóhelyének 20 bázisa követi. Az első bázis (T) az általunk közölt szekvenciában a 3368-as helyzetű bázisnak, az utolsó bázis (G) az 5973-as helyzetű bázisnak felel meg a pN2gpt–gp160 szekvenciában.

A HIV-gp160 génexpressziós kazetta vacciniavírus-genomba való transzferjéhez a mindkét gén-promotor kombinációt (P7,5 promotor-gpt szelekciós marker és S4 promotor-gp160 gén) tartalmazó NotI fragmenst ligáljuk a vdTK vacciniavírus-vektor NotI-gyel hasított DNS-ével, és a pakolást a 7. példában leírtak szerint végezzük. Egy, az inzertált kazettát helyes szerkezetben tartalmazó izolátumot vN2gpt–gp160-nak nevezünk, és ezt alkalmazzuk a gp160 expressziójára afrikai zöldmajom (Vero) sejtekben olyan körülmények között, amelyeket korábban egy hagyományosan szerkesztett rekombináns expressziójára alkalmaztak. [Barrett és munkatársai, Aids Research and Human Retroviruses 6, 159–171 (1989)].

#### *Inzerteket hordozó módosított vírusok szűrővizsgálatára alkalmas vacciniavírus-vektor szerkesztése egy lacZ-gén koinzerciójával*

A pTZgpt–S3AlacZ plazmid (5.5 ábra) hasznos modellszerkezetet képvisel az inszerciók szűrővizsgálatának bemutatására egy E. coli lacZ-génnel találmány szerinti közvetlen klónozási módszerrel való koinzertálásával. A pTZ19R plazmidot (Pharmacia Inc.) PvuII-vel hasítjuk, és a nagy 2,5 kb hosszúságú vektor fragmenst izoláljuk, és NotI linkerekkel (Boehringer Inc.) ligáljuk. A kapott pTZ–N plazmid egy többszörös klónozóhelydeléciót tartalmaz, amely a pTZ19R plazmidban az alfa

kiegészítő peptid szekvenciáján belül lokalizálódik. Ezért pTZ-N-be inzertálandó lacZ-gén és az alfa kiegészítő peptid szekvenciái közötti esetleges rekombinációs események ki vannak zárva.

A közvetlen molekuláris klónozáshoz egy génexpressziós kazetta konstruálására gpt-génkazettát és egy S3A promotert tartalmazó, 1,2 kb hosszúságú NotI fragmenst vágunk ki a pN2gpt-S3A-ból (4. példa), és a pTZ-N-be inzertáljuk, így kapjuk a pTZgpt-S3A plazmidot. A pTKgpt-F1sβ-ból kivágott 3,0 kb hosszúságú EcoRI lacZ fragmenst (Falkner és Moss, 1988) a pTZgpt-S3A egyetlen EcoRI helyére inzertáljuk. A kapott plazmidot pTZgpt-S3AlacZ-nek nevezzük.

A fenti plazmid 4,4 kb hosszúságú NotI fragmensét – amely két markergént (E. coli gpt és lacZ) tartalmaz – a vdTK vírus (4. példa) NotI-gyel hasított DNS-ével ligáljuk. A ligálást és pakolást a 3. példában leírtak szerint végezzük. A módosított vírusok meghatározott hozama gpt-szelekció esetén a 3. példában található.

Egy további vacciniavírus-vektort konstruáltunk az alábbiak szerint. A pTZS4-lacZa és pTZS4-lacZb plazmidok használható modellszerkezeteket képviselnek (5.6 ábra). A pTZ-N plazmidot a fentiek szerint állítottuk elő. A génexpressziós kazettát, a gpt-génkazettát és az S4 promotert tartalmazó 1,2 kb hosszúságú NotI fragmenst, amelyet a pN2gpt-S4 plazmidból vágunk ki (4. példa) és a pTZ-N-be inzertáltuk, az így kapott plazmidot pTZgpt-S4-nek nevezzük. A placZN\* plazmidból – amelyet a pFP-Zsart plazmid (91 114 300–6 számú európai szabadalmi bejelentés, rekombináns szárnyaspoxvirus) NotI-gyel való emésztésével és a pFP-Zsart P-NotI oligonukleotiddal (5'-GGCCAT-3') való ligálásával állítottak elő – kivágtunk egy 3,3 kb hosszúságú SmaI-StuI lacZ fragmenst. Ezt a 3,3 kb hosszúságú SmaI-StuI lacZ fragmenst a pTZgpt-S4 egyetlen SmaI helyére inzertáltuk. A kapott plazmidokat pTZS4-lacZa-nak és pTZS4-lacZb-nek nevezzük.

Ennek a plazmidnak a 4,5 kb hosszúságú NotI fragmensét ligáljuk a vdTK vírus NotI-gyel hasított DNS-ével, és a fent leírtak szerint pakoljuk.

A lacZ és a gpt-szelekció kombinációja egyetlen klónozási lépésben nem nyújt semmiféle előnyt, mivel az összes gpt-pozitív plakk tartalmazni fogja a lacZ-gént. Azonban olyan vírusok szerkesztésére, amelyek különböző helyeken tartalmaznak inszerciákat, egy második szűrővizsgálat kívánatos. Az elsőként választott marker a gpt-marker, de a lacZ-szűrés egy alternatív módszerként jelent az inzertek detektálására, például abban az esetben, ha a cél virális genom már tartalmazza a szelektálható marker egy példányát, például az E. coli gpt-gént.

Az ilyen szűrővizsgálathoz a pakolás után előállított nyersvírus törzstenyészetekből 2 ml 1/10, 1/100 és 1/1000 hígításokat (lásd a 3. példát) 30 db nagyméretű (8,5 cm átmérőjű) Petri-csészébe rétegezzük (hígításonként 10 Petri-csészét használunk). A kék plakk vizsgálatot a standard eljárások szerint végezzük [Chakrabarti S., Brechling K. és Moss B., Mol. Cell. Biol. 5, 3403–3409 (1985)].

#### 6. példa

*Erős, késői vacciniavírus promoter transzkripció szabályozása alatt álló, irányított mesterklónozó-hellyel rendelkező vacciniavírus-vektor (vS4) szerkesztése*

Ebben a példában ismertetjük egy olyan vacciniavírus-klónozó vektor (vS4) megszerkesztését, amelyet egy komplett nyílt leolvasási keret közvetlen molekuláris inzertálására terveztünk egy olyan mesterklónozó-helyre, amely egy vacciniavírus promoterhez van funkcionálisan kötve. Ennek megfelelően ennek a vektor-nak az alkalmazása a találmány szerinti eljárásokkal lehetővé teszi a gének direkt inzertálását egy poxvirus-vektorba egy inszerciós plazmid külön megszerkesztése nélkül, ami a hagyományos rekombináns poxvirusok intracelluláris rekombinációval való előállításához szükséges. Ez a vektor egy génexpressziós kazetta külön megszerkesztését is feleslegessé teszi a vacciniavírus-vektorba való bevitelhez közvetlen molekuláris inszercióval a fentiekben ismertetett módon.

Az S4 vektor mesterklónozóhelye a vacciniavírus-genom genetikailag stabil központi régiójában lokalizálódik, és számos olyan hasítási helyet tartalmaz, amelyek egyenként fordulnak elő a vektorban, ezáltal lehetővé teszik az irányított inszerciót. A mesterklónozóhely előtt közvetlenül elhelyezkedő S4 promoter egy késői vacciniavírus promoter erős, szintetikus variánsa. Ez az expressziós vektor alkalmas olyan nagyméretű, nyitott leolvasási keretek közvetlen klónozására és expressziójára, amelyek egy transzlációs startkodont tartalmaznak, ezt a leírásban egy humán vérproteint, a von Willebrand-faktort (vWF) kódoló cDNS-sel illusztráljuk.

#### vS4 vacciniavírus-vektor szerkesztése

Az S4 vacciniavírus promotert tartalmazó adaptert a vdTK vacciniavírus-vektorba (4. példa, 4.1 ábra) inzertáljuk az egyetlen NotI helyre (6.1 ábra). A kiválasztott adapter oligonukleotidok inszerciója inaktíválja a 3'-irányban elhelyezkedő NotI helyet, míg az 5'-irányban elhelyezkedő NotI hely egyetlen klónozóhelyként funkcióképes marad.

Közelebbről 1 µg vdTK vektor DNS-t (4. példa, 4.1 ábra) NotI-gyel hasítunk, és 0,5 µg P-artP(11) (38. azonosítási számú szekvencia) és P-artP(12) (39. azonosítási számú szekvencia) illesztett oligonukleotiddal ligáljuk. A ligációs elegyet pakoljuk, és a plakkokat a 3. példában leírtak szerint azonosítjuk. A plakkokat PCR szűrővizsgálatnak vetjük alá a leírtak szerint (4. példa, vdTK vírus azonosítása PCR szűrővizsgálattal). Inzertet megfelelő orientációban tartalmazó egyik izolátumot vS4-nek nevezzük.

#### Von Willebrand-faktor cDNS-inzertálása vS4-be

A pvWF plazmid a teljes von Willebrand-faktor cDNS-t tartalmazza NotI helyekkel határolva. A humán vWF szekvenciája ismert [Bonthron D. és munkatársai, Nucl. Acids Res. 14, 7125–7128 (1986)]. Ez a szekvencia az EMBO Adatbankban ID HSVWFR1 néven megtalálható. A 20. azonosítási számú szekvencia mutatja az vvWF vírus genomjában a virális S4 promoter és a jelen vWF cDNS 5'-nem transzlatált régiójának kapcsolódását a pvWF plazmidban a transzlációs

startkodonig (jelen szekvencia szerint a 249-es helyzetű bázis; az ID HSVWFR1-ben a 100-as helyzetű bázis). A vWF kódolórégióját kihagytuk a jelen szekvenciából. A szekvencia a stopkodonnal (252-es helyzetű bázis; az ID HSVWFR1-ben a 8539-es helyzetű bázis), a 3'-nem transzlatált szekvenciával az NotI helyig (304-es helyzetű bázis) és a virális genom vWF 3'-régiójával való átfedés 20 bázisával folytatódik.

A vWF cDNS-fragmenst NotI-gyel felszabadítjuk, izoláljuk, és vS4 vektor-DNS-sel ligáljuk, amelyet NotI-gyel hasítottunk, és foszfatázzal kezeltünk a 6.2 ábrának megfelelően.

A ligált DNS 1 µg-ját a 7. példában leírtak szerint pakoljuk. A plakkokat lekaparjuk, és PCR szűrővizsgálattal analizáljuk. A PCR-reakció első primerje az odTK2 oligonukleotid, amely mintegy 300 bázispárral a tk-gén előtt lokalizálódik; a reverz primer ovWFI az iniciátorkodon után mintegy 50 bázispárra helyezkedik el a vWF génben. A PCR sokszorozás csak akkor megy végbe, hogy ha vWF inzert helyes orientációban van a vektorban az S4 promoterhez viszonyítva. A PCR-pozitív plakkokat azonosítjuk és tovább analizáljuk. Ha a kívánt módosított vírus hozama alacsony (mintegy 0,1–0,01%), úgy is eljárhatunk, hogy in situ plakkhibridizációs módszerrel azonosítjuk, amely módszer a szakirodalomból ismert [lásd például Vileareal L. P. és Berg P. *Science* 196, 183–185 (1977)].

A PCR vagy hibridizációs módszer szerint a cDNS-inzertet tartalmazó vírusklónt, amely PvuII-vel hasítva a várt restriktációs képet mutatja, vWF-nek nevezzük. A von Willebrand-faktor expresszálsát az ilyen vektorok által az 5. példában más humán proteinek ismertetett módszerek szerint vizsgálhatjuk, amelyeket adott esetben a géntechnológiában járatos szakemberek által ismert módon módosíthatunk.

### 7. példa

*Ortopox (vaccinia)-vírus genomiális DNS heterológ pakolása madárhimlő (szárnyashimlő)-helper-vírusral és a módosított vírus szimultán szelekciója olyan gazdaszövetekben, amelyekben a helper-vírus nem tud replikálódni*

A 3. példában ismertetjük a módosított vaccinia-vírus-DNS pakolását helper-szárnyaspoxvírussal szárnyas sejtekben, és ezt követően az utódvírusplakkok izolálását emlős (CV-1)-sejtekben, amelyekben a madárhimlő-helper-vírus nem tud replikálódni. A jelen példában ismertetjük a vacciniavírus-DNS közvetlen pakolását szárnyaspoxvírussal való CV-1-sejtekben, ami lehetővé teszi a szimultán pakolást, és a pakolt vírusra a gazdaspecifikus szelekciót. Amellett, hogy a kiindulási utódtenyészetből elimináljuk a helper-vírust, ezzel az eljárással megkerülhető az a fáradságos munka, hogy minden egyes pakolókísérletben elsődleges csirkeembrió-fibroblaszt tenyészeteket állítsunk elő. Ehelyett a vacciniavírus replikálására szokásosan használt folyamatos emlőssejtvonalak alkalmazhatók a vacciniavírus pakolására helper-szárnyaspoxvírussal.

Ismeretes, hogy a szárnyaspoxvírus (FPV) teljesen csak madársejtekben replikálódik, fertőzött emlőssej-

tekből nem kapható életképes utódvírus. Az FPV életciklusának azon meghatározott pontja, amelynél emlőssejtekben a replikáció meghiúsul, nem ismeretes. Az FPV azonban emlőssejtekben ismert módon képes virális proteinek képezni, és még védőimmunitást is képes indukálni emlősökben, ha élő vaccinaként alkalmazzuk [Taylor és munkatársai, *Vaccine* 6, 497–503 (1988)]. Azonban az FPV-ről korábban nem bizonyították, hogy képes lenne heterológ poxvírus genomiális DNS, különösen közvetlenül manipulált vacciniavírus DNS heterológ pakolására.

A kiindulási kísérletben  $5 \times 10^6$  CV-1-sejtet 1 pfu/sejt szárnyaspoxvírussal (HP1.441 törzs) fertőzünk, és 1 órán keresztül inkubáljuk. Ezt követően a fertőzött sejtekbe egy kalcium-foszfátos precipitátumot transzfektálunk, amelynek 1 ml-je 1 µg vad típusú vacciniavírus-DNS-t tartalmaz. 15 perc elteltével szobahőmérsékleten hozzáadunk 10 ml, 10% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM tápközeget. A sejteket 4 órán keresztül inkubáljuk, majd a tápközeget cseréljük. A sejteket ezután 6 napon keresztül inkubáljuk, így módon kapjuk a nyersvírus törzstenyészetet. Az utódvírust CV-1-sejteken titráljuk. A tipikus vacciniaplakkok 2 nap elteltével válnak láthatóvá.

A pakolás hatékonyságának az alkalmazott genomiális vírus-DNS mennyiségétől való függését 0,1–10 µg DNS/ $5 \times 10^6$  CV-1-sejt tartományban határoztuk meg (7.1 ábra). Az 1 µg-ot meghaladó mennyiségű DNS (például 10 µg) durva kalcium-foszfátos precipitátumot eredményez, amely csökkenti a transzfekció hatékonyságát pfu/µg bevitt DNS-re számolva (7.1 ábra).

A pakolt vacciniavírus hozamának a pakolás inkubációs idejétől való függésére konstans mennyiségű vad típusú vírus-DNS-t (1 µg) és konstans mennyiségű FPV helper-vírust (1 pfu/sejt) alkalmaztunk a kiindulási kísérletre fent leírt körülmények között, azzal az eltéréssel, hogy a transzfektálás után 15 perccel hozzáadott tápközeget 4 óra múlva cseréltük ki, és a sejteket ezután további 1 óra–5 napon keresztül inkubáltuk a nyersvírus törzstenyészet elkészítése előtt (összterfogat 2 ml). A csak FPV-vel fertőzött kontrollsejtekből származó, 5 napon keresztül inkubált vírus törzstenyészetben nem keletkeztek látható plakkok. Ezt a kísérletet háromszor ismételtük meg, és a tipikus eredményeket a 7.1 táblázatban ismertetjük.

7.1 táblázat

Inkubációs idő hatása az emlőssejtekben (CV-1) helper-szárnyaspoxvírussal végzett DNS-pakolásból származó vacciniavírus hozamára

| Inkubációs idő (óra) | Titer (pfu/ml)    |
|----------------------|-------------------|
| 24                   | $1,0 \times 10^2$ |
| 48                   | $4,6 \times 10^4$ |
| 72                   | $5,0 \times 10^5$ |
| 96                   | $5,6 \times 10^6$ |
| 120                  | $2,1 \times 10^7$ |

A pakolt vacciniavírus titere – amelyet plakkvizsgálattal határoztunk meg emlőssejtekben (CV-1) – folyamatosan növekedik a 24 órás mintegy  $10^2$  pfu/ml-ről a 120. óráig, amikor is a titer mintegy  $2 \times 10^7$  pfu/ml. 48–72 órás inkubálási időintervallumban célszerű mennyiségű pakolt vacciniavírus keletkezik (mintegy  $10^4$ – $10^6$  pfu/ml), így ezek az inkubációs idők megfelelnek vacciniavírus-DNS rutinszerű pakolására szárnyas-poxvírussal emlőssejtekben.

*Vaccinia-DNS pakolása szárnyas-poxvírussal abortív fertőzött emlőssejtekben*

Korábban kimutatták, hogy a szárnyas-poxvírus fertőzhet ugyan emlőssejteket, de a vírus életciklusa ezekben a nem tipikus gazdasejtekben nem teljes. A sejt típusától függően a virális növekedés vagy a korai, vagy a késői stádiumban leáll, és nem keletkeznek életképes szárnyas-poxvírusok (Taylor és munkatársai, 1988). Ezen kísérleti eredmények miatt végeztük el a vaccinia-DNS pakolásának vizsgálatát egy összefüggő emlőssejtvonalban.

CV-1-sejtek összefüggő egyrétegű tenyésztet 0,05 pfu/sejt FPV HP1.441 törzssel fertőztük, és egy NotI-gyel hasított vacciniavírus-DNS-t és egy NotI helyekkel határolt gpt-génkazettát tartalmazó ligációs eleggyel transzfektáltuk. Közelebbről 1 µg vaccinia-DNS-t NotI-gyel emésztettünk, és ligáltuk az inzert DNS (P7,5-gpt-génkazetta) megadott mennyiségeivel. A vacciniavírusban az egyetlen NotI hely a HindIII F fragmensben egy intergén régióban lokalizálódik [Goebel és munkatársai, Virology, 179, 247 (1990)]. 3 napos inkubálás után a sejteket összegyűjtjük, és a vírus törzstenyésztet CV-1-sejteken titráljuk gpt-szelektív médium jelenlétében (+MPA) vagy távollétében (–MPA). Az eredményeket a 7.2 táblázatban összegezzük.

7.2 táblázat  
Abortív pakolás utáni titerek

| A kísérlet száma | Inzert (ng) | Titerek<br>(pfu $\times 10^{-2}/6 \times 10^6$ sejt) |       | Kimérák (%) |
|------------------|-------------|------------------------------------------------------|-------|-------------|
|                  |             | –MPA*                                                | + MPA |             |
| 1.               | 200         | 17,2                                                 | 1,6   | 9,3         |
| 2.               | 200         | 42,5                                                 | 5,1   | 12,3        |
| 3.               | 400         | 64,0                                                 | 3,8   | 5,9         |
| 4.               | 400         | 26,8                                                 | 3,8   | 14,2        |
| 1.               | 200         | 17,2                                                 | 1,6   | 9,3         |
| 5.               |             | 210,0                                                |       |             |

\*MPA = mikofenolsav.

A legfontosabb eredmény az volt, hogy a szárnyas-poxvírus képes módosított vaccinia-DNS pakolására olyan sejttípusban, melyben ő maga nem képes szaporodni. Ezenkívül a kiméraplakkok hozama 5–10%-os tartományban volt. Ez előnyösen hasonlítható össze a klasszikus in vivo rekombinációs technikával, amelyben rendszerint a rekombinánsok az összes plakkoknak mintegy 0,1%-át teszik ki. Csak a vektorkarok ligálása

(7.2 táblázat, 5. kísérlet) magasabb titert eredményezett az inzertekkel végzett 1–4. számú ligációs kísérletekhez képest, valószínűleg az agarózban tisztított inzert molekulák szennyeződéseinek hiánya miatt.

Az izolált vírusok közül néhányat plakk-tisztítottunk és tovább jellemeztünk. Ezek a vacciniavírus jellegzetes HindIII restrikciós képét mutatták, és ezenkívül az egyetlen inzert két lehetséges orientációjára jellemző idegen génsávokat. Az NotI helyre való inzertálással nem kaptunk olyan vírust, amely többszörös inzertet tartalmazott volna.

Heterológon pakolt kiméra-vacciniavírusok nem kereszthibridizálnak szárnyas-poxvírussal. Az FPV általi heterológ pakolás kiméra-vacciniavírusok szerkezetére való hatásainak tanulmányozására az F13.4, F12.5, F13.2 és F12.4 számú DNS-izolátumokat, az NotI-gyel végzett klónozókísérletből származó négy tisztított izolátumot és a szárnyas-poxvírus-kontrollokat is HindIII-mal emésztettük, és a kapott fragmenseket elektroforézissel elválasztottuk, és Southern-blot-hibridizációval analizáltuk egy szacharóz gradiensen tisztított virionokból előállított szárnyas-poxvírus-próbával. A vacciniavírusok nem adtak kereszthibridizációt az FPV DNS-sel.

8. példa

*Módosított vacciniavírus genomiális DNS homológ pakolása egy vacciniavírus gazdaspecificitás mutáns (vdhr), amely nem képes humán sejtvonalakban replikálódni*

Ebben a példában mutatjuk be egy helperpoxvírus szerkesztését és alkalmazását, amely olyan deléciókat tartalmaz, amelyek korlátozzák annak gazdaspecificitását, különösen azon képességét, hogy bizonyos humán sejtvonalakban replikálódjon. Helpervírustól mentes módosított vacciniavírus állítható elő a vektor-DNS ezen mutáns helpervírussal való pakolásával, és a módosított vírusklónok megfelelő humán sejtek fertőzése általi izolálásával.

Ez a mutáns helpervírus a vacciniavírus gazdaspecificitás mutánsaiból származik, amelyek nem képesek különféle humán sejtvonalakban replikálódni, és megváltozott citopátiás hatást mutatnak számos egyéb sejtvonalra is, amelyek egyébként vad típusú vacciniavírral fertőzhetők [lásd például Drillien és munkatársai, Virology 111, 488–499 (1981)]. Közelebbről ezen helpervírus genomja két gazdaspecificitás génmutációját tartalmazza, amelyek együtt megakadályozzák a vírus replikációját humán (MRC 5) sejtekben, amelyekben csak a legalább egy intakt gazdaspecificitás génnel rendelkező vacciniavírus-genomok tudnak replikálódni.

*Gazdaspecificitás mutáns vacciniavírus (vdhr) szerkesztése*

Gillard és munkatársai leírták egy vacciniavírus-gén genomiális lokalizációját és DNS-szekvenciáját, amely a humán sejtekben való replikációhoz szükséges [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5573–5577 (1986)]. Jelenleg ezt a gént K1L-nek nevezik [Goebel és munkatársai (1990)]. Egy másik vacciniavírus gazdaspecificitás gént is feltérképeztek [Perkus és munkatársai, J. Virology 63, 2829–2836 (1990)]. Ez a második gén – amelyet

Goebel és munkatársai (1990) után C7L-nek neveznek – a HindIII C és HindIII N fragmenseket magában foglaló régióban fekszik. Ez a régió a vacciniavírus WR6/2 törzsből delécióval törölve van [Moss és munkatársai, J. Virol. 40, 387–395 (1981)]. A WR6/2 törzsből ezért hiányzik a C7L gazdaspecifititás gén.

A vdhr helpervírust – amelyből mind a K1L, mind a C7L gazdaspecifititás gén hiányzik – a C7L-negatív WR6/2 törzsből konstruáltuk markermentési módszerrel, egy módosított EcoRI K fragmensen, amelyből a K1L gazdaspecifititás gént delécióval töröltük (lásd a 8.1 ábrát). Ez a módosított EcoRI K fragmens egy szelektív marker gént (E. coli gpt-gén) tartalmaz a módosított EcoRI K fragmenst tartalmazó módosított WR6/2 genomok szelektálásának elősegítésére, intracelluláris markermentést alkalmazva Sam és Dumbell (1981) módszere szerint. Perkus és munkatársai (1989) ismertettek egy feltételes letális mutánst is, amely nem rendelkezik a humán sejt vonalakra való szaporodás képességével.

Közelebről úgy járunk el, hogy a vad típusú vacciniavírus-DNS 5,2 kb hosszúságú EcoRI K fragmensét a pFP-tk18i plazmidba szubklónozzuk. A kapott plazmidot pFP-EcoK1-nek nevezzük. A vacciniavírus gazdaspecifititás K1L gént Gillard és munkatársai, (1986) töröljük, és ezzel egyidejűleg egy egyedi NotI helyet vezetünk be „loop-out” mutagenézissel, P-hr(3) oligonukleotid (42. azonosítási számú szekvencia) alkalmazásával. A kapott plazmidot pEcoK-dhr-nek nevezzük.

A pFP-tk18i plazmidot a pFP-tk-10.4 plazmid módosításával szerkesztjük meg (lásd Falkner és munkatársai, 89303887.7 számú, 0338 807 számon publikált európai szabadalmi leírás 3. és 8. példája, és a teljes kitanítás, amelyet jelen bejelentésünkben referenciaként beépítettünk). A pFP-tk10.4 plazmidot NcoI-gyel emésztjük, és egy adapterral ligáljuk, amely a P-NcoI(1) és P-NcoI(2) illesztett nukleotidokból áll, ezáltal az FPV tk-gén egyetlen EcoI helyére egy többszörös klónozóhelyet vezetünk be, amely az EcoRI, NotI és HindIII restrikciós endonukleáz hasítási helyeket tartalmazza.

A vacciniavírus szekvenciáját Goebel, S. J. és munkatársai publikálták [Virology 179, 247–266 (1990)]. Ez a szekvencia az EMBO Adatbankban (Génbank) M35027 számon hozzáférhető. A vacciniavírus gazdaspecifititás K1L gén szekvenciáját Gillard S. és munkatársai publikálták [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5573–5577 (1986)] és az EMBO Adatbankban (Génbank) ID PXVACMHC azonosítási néven hozzáférhető. Ezért a K1L gén kódolószekvenciáját nem közöltük a 21. azonosítási számú szekvenciában. A pEcoK-dhr-ben a K1L gén delécióval törölve van, és egy NotI hellyel van helyettesítve. Látható a PXVACMHC szekvencia és az inzert NotI hely kapcsolódó régiója (1–20-as helyzetű bázisok jelen szekvenciánkban, amelyek az ID PXVACMHC-ben a 72–91-es helyzetű bázisoknak felelnek meg). A K1L kódolórégiója delécióval törölve van, és ez helyettesítve van egy NotI hellyel, amelyet két G-maradék követ (21–30-as helyzetű bázis-

sok jelen szekvenciában). A szekvencia egy 20 bp hosszúságú határolórégióval folytatódik (31–50-es helyzetű bázisok jelen szekvenciában; az ID PXVACMHC-ben a 944–963-as helyzetű bázisok).

A következő lépésben a pEcoK-dhr-t NotI-gyel linearizáljuk, és a pN2-gpta plazmidból (4. példa) NotI-es emésztéssel kapott 1,1 kb hosszúságú P7,5-gpt-génkazettával ligáljuk. A kapott pdhr-gpt plazmidot használjuk a vdhr helper vírus előállítására.

A pEcoK-dhr-be illesztett NotI kazetta – amely a P7,5 promotor-gpt-génkzettát tartalmazza – és az 5'- és 3'-határolórégiók 20 bázisa látható a pdhr-gpt-re megadott 22. azonosítási számú szekvenciában. A határolórégió (1–20-as helyzetű bázisok jelen szekvenciában) az ID PXVACMHC szekvenciában a 72–91-es helyzetű bázisoknak felelnek meg (lásd a pEcoK-dhr-re megadott 21. azonosítási számú szekvenciát). Az inzertált DNS-szekvencia a 21-es helyzetben kezdődik (egy NotI hely első G-maradéka) és az 1189-es helyzetben ér véget (egy NotI hely utolsó C-maradéka). A gpt-gén transzlációs iniciátorkodonjának A-maradéka az 548-as helyzetnek felel meg. A gpt-gén transzlációs stopkodonjának T-maradéka az 1004-es helyzetnek felel meg. A szekvencia a határolórégió 20 bázisával folytatódik (jelen szekvenciában az 1192–1209-es helyzetű bázisok; az ID PXVACMHC-ben a 944–961-es helyzetű bázisok. A jelen szekvenciában 1190-es és 1191-es helyzetben lévő két G-maradék a pEcoK-dhr 29-es és 30-as helyzetének felel meg.

Az Eco K fragmens vacciniavírusba való beviteléhez a plazmidot WR6/2 vacciniavírus deléciós mutánssal fertőzött elsődleges csirkeembrió-fibroblaszt sejtekbe transzfektáljuk. A gpt-pozitívként szelektáljuk a módosított vírusokat (mikofenolsav alkalmazásával). A gpt-pozitív plakkokat háromszor plakk tisztítjuk CEF sejtekben és vdhr-nek nevezzük.

#### *A vdhr helpervírus jellemzése*

A gpt-pozitív vdhr vacciniavírus szerkezetét Southern-blot-analízissel és specifikus vizsgálatokkal határoztuk meg. A vdhr vírus csirkeembrió-fibroblasztokon és két majomsejtvonalon (BSC40 és Vero) plakkokat tud képezni, de az MRC-5 humán sejt vonalban nem képes replikálódni.

#### *Módosított vacciniavírus-DNS pakolása helpervírusként vdhr gazdaspecifititás mutáns alkalmazásával*

A fenti megoldás hasznosítását a humán protrombint kódoló cDNS expressziójára szolgáló szerkezet szemlélteti. Az 5. példa 5.1 ábráján ismertetett ligációs elegyből származó terméket helpervírusként vdhr-rel fertőzött csirkeembrió-fibroblasztokba transzfektáljuk. 2 nap múlva a sejteket összegyűjtjük, és előállítjuk a nyersvírus törzstenyészetet. A pakolt vírust plakkképzés szempontjából humán MRC-5 sejteken vizsgáljuk, amelyekben a kívánt vacciniavírus replikálódik, de a mutáns vdhr helpervírus nem. 3 nap elteltével a sejteket semleges vörössel festjük, és további Southern-blot-analízissel szelektáljuk a plakkokat. A kívánt szerkezettel rendelkező módosított vacciniavírus-klónokat azonosítjuk. Várhatóak olyan vírusok is, amelyek az erő-

sen homológ helpervírussal rekombináción mentek keresztül.

#### 9. példa

*HIV-gp160-at kódoló új kiméra-vacciniavírusok (vP2-gp160<sub>MNA</sub>, vP2-gp160<sub>MNB</sub> és vSclP-gp160<sub>MN</sub>) szerkesztése és a rekombináns gp160<sub>MN</sub> expressziója Vero-sejtekben*

Ebben a példában szemléltetjük egy rekombináns vacciniavírus előállítását közvetlen molekuláris klónozással a HIV-1<sub>MN</sub> izolátum gp160-jának nagy léptékű előállítására. A Ratner és munkatársai [Nature 313, 277–284 (1985)] által ismertett HIV<sub>IIIB</sub> izolátum gp160-jának expresszióját hagyományosan szerkesztett vacciniavírus expressziós vektor alkalmazásával Barrett és munkatársai [AIDS Research and Human Retroviruses 5, 159–171 (1989)] ismertették. Azonban a HIV<sub>IIIB</sub> izolátum egy igen ritka HIV-variáns. A HIV-burokproteinek alapuló vakcinák kifejlesztésére irányuló kísérleteknek sokkal gyakoribb HIV-1 izolátumokra, például MN-izolátumokra is ki kell terjednie [Gurgo és munkatársai: Virology 164, 531–536 (1988); Carrow és munkatársai: Aids Research and Human Retroviruses 7, 831–839 (1991)]. Ennek megfelelően a találmány szerinti vacciniavírus-vektorokat közvetlen molekuláris klónozással a HIV<sub>MN</sub> izolátumok gp160 proteinjének expresszáására szerkesztettük.

*pP2-gp160<sub>MN</sub> plazmid és a vP2-gp160<sub>MNA</sub> és vP2-gp160<sub>MNB</sub> kiméravírusok szerkesztése*

A gp160 gén vacciniavírusba való inzertálására az alábbi stratégiát alkalmazzuk: (i) a gp160 gént a nagy 5'-nem transzlatált régió (5'-UTR) eltávolításával és a startkodontól felfelé egy megfelelő klónozóhely bevezetésével módosítjuk; (ii) a módosított gp160 gént a szárnyaspoxvírus erős, késői P2 promotertől lefelé klónozzuk (91 114 300–6 számú európai szabadalmi bejelentés, 1991. augusztus 26.), és (iii) a P2-gp160 és P7,5-gpt génkazettákból álló tompa végű fragmenst egy megfelelő vírus gazdatörzs egyetlen restriktációs endonukleáz hasítási helyére, például a vD<sub>1</sub> vaccinia gazdatörzs (4. példa) SmaI helyére vagy a WR 6/2 vaccinia törzs [Moss és munkatársai: J. Virol. 40, 387 (1981)] vagy a vad típusú WR vaccinia törzs SmaI vagy NotI helyére inzertáljuk.

A fenti célra a pN2gpt-S4 plazmidba (4. példa) egy új SmaI helyet vezetünk be, amelynek eredményeképpen kapjuk a pS2gpt-S4 plazmidot (9.1 ábra, 62. azonosítási számú szekvencia). Ezt követően az S4 promotert P2 promoterral helyettesítjük, amelynek eredményeképpen kapjuk a pS2gpt-P2 plazmidot (63. azonosítási számú szekvencia). Ez a plazmid lehetővé teszi a teljes nyitott leolvasási keretek (orf-ek) klónozását, de saját startkodonnal nem rendelkező, nem teljes orf-ek klónozására is alkalmazható; a startkodon akkor keletkezik, amikor például a fenti plazmid egyetlen NcoI helyére (CCATGG) klónozzuk. A plazmidok és vírusok szerkesztését alább részletesen ismertetjük. A gp160 gén módosítására egy PCR-rel előállított proximális helyzetű fragmens kicserélésével egy minimális 5'-

UTR-rel rendelkező gp160 génkazettát állítunk elő. Ez a kazetta van jelen a végtermékben, vagyis a pP2-gp160<sub>MN</sub> plazmidban (9.1 ábra, 69. azonosítási számú szekvencia). A plazmid további jellemzői az alábbi táblázatban vannak összefoglalva.

*pP2-gp160<sub>MN</sub> (6926 bp)  
(69. azonosítási számú szekvencia)*

| Helyzet      | Leírás                                                                                      |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1–3529       | pS2gpt-P2 szekvenciák                                                                       |
| 10 2396–2851 | E. coli gpt-gén rcCDS-ja                                                                    |
| 2851         | a gpt-gén rc TAC iniciációs kodonjának T-je                                                 |
| 2395         | rc TTA stopkodon A-ja                                                                       |
| 3081–3323    | a P7,5 vaccinia promoter rc-ja                                                              |
| 15 3358–3526 | az idézett európai szabadalmi leírás szerinti P2 promoter szekvencia avipox „intergé régió” |
| 3534–6001    | a HIV-1 <sub>MN</sub> törzs gp160 szekvencia CDS-a (EMBL ID REHIV <sub>MN</sub> C)          |
| 20 3534      | a gp160 <sub>MN</sub> ATG iniciátor-kodonjának A-ja                                         |
| 6102         | a gp160 <sub>MN</sub> TAA stopkodonjának T-je                                               |
| 25 6173–6926 | pS2gpt-P2 szekvenciák                                                                       |

A plazmidokat az alábbiak szerint konstruáljuk.

*pS2gpt-S4 szerkesztése*

A pN2gpt-S4 plazmidot (4. példa) XbaI-gyel emésztjük és egy SmaI adapterrel (43. azonosítási számú szekvencia: 5'-CTAGCCCGGG-3') ligáljuk, ezáltal aktiváljuk az XbaI helyet, és egy SmaI helyet alakítunk ki. A kapott plazmidot pS2gpt-S4-nek nevezzük (62. azonosítási számú szekvencia). A fenti plazmid további jellemzőit az alábbi táblázatban közöljük.

*pS2gpt-S4 (4145 bp)  
(62. azonosítási számú szekvencia)*

| Helyzet      | Leírás                                                                                                                              |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1–2226       | 14. azonosítási számú szekvencia pN2gpt-S4 szekvenciái. Az 1-es helyzet az első G nukleotidnak felel meg 5'-TGGCACTTT TCGGGGAAAT-3' |
| 40 2227–2236 | SmaI adapter                                                                                                                        |
| 2227–2236    | 5'-CTAGCCCGGG-3'                                                                                                                    |
| 45 2396–2851 | E. coli gpt-gén rcCDS-ja                                                                                                            |
| 2851         | gpt gén rc TAC iniciátor-kodonjának T-je                                                                                            |
| 2395         | rc TTA stopkodonjának A-ja                                                                                                          |
| 3081–3323    | vaccinia P7,5 promoter rc-ja                                                                                                        |
| 50 3358–3451 | 14. azonosítási számú szekvencia S4 promotere [P-artP(9) oligonukleotid]                                                            |
| 2237–4145    | 14. azonosítási számú szekvencia pN2gpt-S4 szekvenciái                                                                              |

*pS2gpt-P2 szerkesztése*

A pS2gpt-S4 plazmid S4 promoter szegmensét PstI-gyel és HpaI-gyel való hasítással eltávolítjuk, és egy 172 bp hosszúságú PstI-HpaI P2 promoter szegmenssel helyettesítjük. Ezt a promotert PCR technikával állítjuk elő a pTZgpt-P2a plazmiddal (Falkner és

munkatársai, 91 114 300–6 számú európai szabadalmi bejelentés) mint templáttal, és primerként a P–P2 5'–(1) és P–P2 3'–(1) oligonukleotidokkal. A PCR terméket PstI-gyel és HpaI-gyel hasítjuk, és a pS2gpt–S4 PstI és HpaI hasítással előállított nagy fragmensével ligáljuk. A P–P2 5'–(1) szekvenciája (44. azonosítási számú szekvencia): 5'-GTACGTACGG CTGCAGTTGT TAGAGCTTGG TATAGCGGAC AACTAAG-3'; a P–P2 3'–(1) szekvenciája (45. azonosítási számú szekvencia): 5'-TCTGACTGAC GTTAACGATT TATAGGCTAT AAAAAATAGT ATTTTCTACT-3'. A PCR fragmens helyes szekvenciáját a pS2gpt–P2-nek nevezett végtermék plazmid (63. azonosítási számú szekvencia) szekvenálásával azonosítjuk. Szekvencia primerként P–SM(2)-t (46. azonosítási számú szekvencia: 5'-GTC TTG AGT ATT GGT ATT AC-3') és P–SM(3)-at (47. azonosítási számú szekvencia: 5'-CGA AAC TAT CAA AAC GCT TTA TG-3') alkalmazunk. A kapott pS2gpt–P2 plazmid jellemzői az alábbi táblázatban láthatók.

| <i>pS2gpt–P2 (4277 bp)</i><br>(63. azonosítási számú szekvencia) |                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Helyzet                                                          | Leírás                                                                          |
| 1–3357                                                           | pS2gpt–S3 szekvenciák                                                           |
| 2396–2851                                                        | E. coli gpt-gén rcCDS-ja                                                        |
| 2851                                                             | a gpt-gén rc TAC iniciátor-kodonjának T-je                                      |
| 2395                                                             | rc TTA stopkodon A-ja                                                           |
| 3081–3323                                                        | vaccinia P7,5 promotor rc-ja                                                    |
| 2358–3526                                                        | P2 promotor szekvencia az EP szabadalmi leírás szerinti, avipox „intergénrégió” |
| 3527–4277                                                        | pS2gpt–S4 szekvenciák                                                           |

#### *p<sub>MN</sub>env2 szerkesztése*

A p<sub>MN</sub>env1 plazmidot R. Gallo (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland) bocsátotta rendelkezésünkre. Ez a HIV<sub>MN</sub> törzs gp160 génjét tartalmazza 3,1 kb hosszúságú EcoRI–PvuII fragmensként klónozva a pSP72 vektorban (Promega, Inc.). A p<sub>MN</sub>env1 0,6 kb hosszúságú EcoRI–Asp718 fragmensét egy 0,13 kb hosszúságú EcoRI–Asp718 fragmenssel helyettesítjük, ezáltal a gp160 gén 5'-nem transzlátált régiójának nagy részét eltávolítjuk. Ezt a 0,13 kb hosszúságú fragmenst PCR technikával állítjuk elő templátként p<sub>MN</sub>env1 plazmidot és primerként p–<sub>MN</sub>(1) és P–<sub>MN</sub>(2) oligonukleotidokat alkalmazva. Az első P–<sub>MN</sub>(1) primer egy StuI helyet is bevisz, a startkodontól 1 bázispárral felfelé. A P–<sub>MN</sub>(1) szekvenciája (48. azonosítási számú szekvencia): 5'-AGCTAGCTGA ATTCAGGCCT CATGAGAGTG AAGGGGATCA GGAGGAATTA TCA-3'; a P–<sub>MN</sub>(2) szekvenciája (49. azonosítási számú szekvencia): 5'-CATCTGATGC ACAAATAGA GTGGTGGTTG-3'. A kapott plazmidot p<sub>MN</sub>env2-nek nevezzük. A PCR-rel előállított fragmens mutációinak kiküszöbölésére ezt a plazmidot a P–Seq (2) primerrel (50. azonosítási számú szekvencia: 5'-CTG TGG GTA CAC AGG CTT GTG TGG CCC-3') és P–Seq (3) primerrel (51. azonosítási számú szekvencia: 5'-CAA TTT TTC TGT AGC ACT ACA GAT C-3') szekvenáltuk.

#### *pP2-gp160<sub>MN</sub> szerkesztése*

A p<sub>MN</sub>env2 plazmidból izolált, <sub>MN</sub>gp160 gént tartalmazó 2,7 kb hosszúságú StuI–PvuII fragmenst a pS2gpt–P2 HpaI helyére inzertálva kapjuk a pP2–gp160<sub>MN</sub> plazmidot (69. azonosítási számú szekvencia).

A vP2–gp160<sub>MN</sub>A és vP2–gp160<sub>MN</sub>B kiméravírusokat az alábbiak szerint szerkesztettük meg. A P2–gp160 és P7,5-gpt génkazettából álló SmaI fragmenst közvetlen molekuláris klónozással illesztettük a vdTK gazda vaccinia törzs (4. példa) egyetlen SmaI helyére, így kaptuk a vP2–gpt160<sub>MN</sub>A és vP2–gp160<sub>MN</sub>B kiméravírusokat (9.2 ábra). Közelebbről a 4. példa szerinti vdTK vacciniavírust egyetlen SmaI helyén hasítottuk, és a P7,5-gpt és P2–gp160 génkazettákat tartalmazó 4,0 kb hosszúságú SmaI fragmenssel ligáltuk. Hasonlóképpen a WR6/2 vaccinia törzset is hasítottuk az egyetlen SmaI (NotI) helyen, és ligáltuk a P7,5-gpt gén és P2–gp160 génkazettát tartalmazó 4,0 kb hosszúságú SmaI (NotI) fragmenssel. A klónozási eljárást az 1. példában leírtak szerint hajtottuk végre. A vP2–gp160<sub>MN</sub>A vírusban a gp160 gén ugyanolyan irányban íródik át, mint a virális timidin-kináz környezetében lévő gének; a vP2–gp160<sub>MN</sub>B vírusban a gp160 gén fordított irányban íródik át. Mivel a gén helyzetéből adódó hatások befolyásolhatják az expresszió szintjét a génszabályozási úton előállított vacciniavírusokban, a P2–gp160 és P7,5-gpt génkazettákat tartalmazó SmaI (NotI) fragmenst a WR 6/2 törzs SmaI (NotI) helyére is inzertáltuk. Az in vivo pakolást a 3. példában leírtak szerint végeztük.

#### *A kiméravírusok szerkezete*

A kiméravírusok várt szerkezetének megerősítésére (9.3 ábra) Southern-blot-analízist végeztünk. A tisztított vírusok DNS-eit PstI-gyel hasítottuk, és a kapott fragmenseket agarózgélén szétválasztottuk, nitrocellulóz membránra vittük, és vaccinia timidin-kináz (tk)-gén és gp160 génpróbával hibridizáltuk. A tk-gén-próbával a vP2–gp160<sub>MN</sub>A esetében láthatók a várt 6,9 és 14,3 kb hosszúságú fragmensek, és a vP2–gp160<sub>MN</sub>B esetében a várt 8,7 és 12,5 kb hosszúságú fragmensek. A gp160 próbával (p<sub>MN</sub>env1) látható a vP2–gp160<sub>MN</sub>A várt 14,3 kb hosszúságú, és a vP2–gp160<sub>MN</sub>B várt 8,7 kb hosszúságú fragmense, megerősítve ezáltal az idegen génkazetták beépülését két különböző orientációban.

#### *vP2–gp160<sub>MN</sub>A és vP2–gp160<sub>MN</sub>B kiméravírusokkal végzett expressziós kísérletek*

Az expresszió vizsgálatát Vero-sejteken végeztük. A sejtek tenyésztését, kiméravírusokkal való fertőztetését, és a rekombináns gp160 protein tisztítását Barrett és munkatársai fent idézett eljárásai szerint hajtottuk végre.

#### *gp160 Western-blot-analízise*

A Western-blotokat lényegében Towbin és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6672–6676 (1979)] módszere szerint hajtottuk végre. Az első antitest egy egér monoklonális anti-HIV–gp120 antitest (Du Pont, Inc. No. NEA9305), amelyet 1:500-as hígításban alkalmaztunk. A második antitest egy kecske-anti-egér IgG (H+L) lúgos foszfátázzal kapcsolva

(BioRad., Inc., No. 170–6520), amelyet 1:1000-es hígításban alkalmaztunk. A BCIP és NBT reagensek és a festési eljárás a Promega Inc.-től származnak.

*pselP–gp160<sub>MN</sub> plazmid és a vselP–gp160<sub>MN</sub> kimé-ravírus szerkesztése*

A selP szintetikus korai/késői promotert (70. azonosítási számú szekvencia) [S. Chakrabarti és B. Moss; 91 114 300–6 számú európai szabadalmi bejelentés, Rekombináns szárnyaspoxvírus] – amely a legerősebb ismert vacciniavírus promoterek egyike – alkalmaztuk ebben a példában a HIV–1<sub>MN</sub> törzs gp160 génjének expresszáására. Először megszerkesztettük a pselP–gpt–L2 plazmidot (9.4 ábra). Ez a plazmid magában foglalja a selP promotert, amelyet egy többszörös klónozóhely követ a teljes vagy nem teljes nyitott leolvasási keretek formájában lévő idegen gének inzertálására, és translációs stopkodonok mindegyik leolvasási keretben, amelyeket a vacciniavírus korai transzkripció stopjel (TTTTTNT) követ [Rohrmann és munkatársa: Cell. 46, 1029–1035 (1986)]. A P7,5-gpt-gén-kazetta a promoter szomszédságában lokalizálódik, és domináns szelekciós markerként szolgál [Falkner és munkatársai: J. Virol. 62, 1849–1854 (1988)]. A selP promoter markergénkzettákat restriktions endonukleáz hasítási helyek határolják, amelyek a vacciniavírus genomban egyediek (SfiI, NotI, RsrII), és tompa végű fragmensként is kivághatók (például HpaI-gyel és SnaBI-gyel végzett hasítással). A gp160 gén pselP–gpt–L2-be való inzertálására egy NcoI helyet vezetünk be a translációs startkodon közelében. Ez a mutáció az arginin (AGA) alaninnal (GCC) való helyettesítését eredményezi. Nem valószínű, hogy ez a mutáció a szignálpeptid második aminosavában zavarja a gp160 gén kielégítő expresszióját. A klónozási eljárás és a vad típusú és módosított gp160 gén körüli szekvencia a 9.5 ábrán látható. A fenti mutáció gp160 génbe való bevezetésére egy PCR-technikával előállított központi fragmenst cseréltünk ki. A plazmidok szerkesztését részletesebben alább ismertetjük.

*pL2 szerkesztése*

A pL2 szerkesztésére a pTM3 plazmid [Moss és munkatársai: Nature, 348, 91 (1990)] 0,6 kb hosszúságú XbaI–ClaI fragmensét helyettesítettük egy XbaI–ClaI adapter fragmenssel, amely az összeillesztett o–542 oligonukleotidból (52. azonosítási számú szekvencia: 5'-CGA TTA CGT AGT TAA CGC GGC CGC GGC CTA GCC GGC CAT AAA AAT-3') és o–544 oligonukleotidból (53. azonosítási számú szekvencia: 5'-CTA GAT TTT TAT GGC CGG CTA GGC CGC GGC CGC GTT AAC TAC GTA AT-3') áll. A fenti klónozási lépésből származó köztes plazmidot pL1 plazmidnak nevezzük. A 0,84 kb hosszúságú AatII–SphI fragmenst (a nem kódoló gpt-szekvenciák része) egy AatII–SphI adapter fragmenssel helyettesítettük, amely az összeillesztett o–541 oligonukleotidból (54. azonosítási számú szekvencia: 5'-CTT TTT CTG CGG CCG CGG ATA TGG CCC GGT CCG GTT AAC TAC GTA GAC GT-3') és o–543 oligonukleotidból (55. azonosítási számú szekvencia: 5'-CTA CGT AGT TAA CCG GAC CGG

GCC ATA TAG GCC GCG GCC GCA GAA AAA GCA TG-3') áll. A kapott plazmidot pL2-nek nevezzük.

*pTZ–L2 szerkesztése*

5 Az XbaI–SphI fragmenst (amely a T7-promoter-EMC-T7-terminátor szegmensből, a többszörös klónozóhelyből és a P7,5-gpt-génkzettából áll) Klenow-polimerázzal kezeljük, és a pTZ19R plazmid (Pharmacia, Inc.) PvuII helyei közé inzertáljuk. A kapott plazmidot pTZ–L2-nek nevezzük (64. azonosítási számú szekvencia). A plazmid további jellemzői az alábbi táblázatban láthatók.

*pTZ–L2 (4701 bp)*

*(64. azonosítási számú szekvencia)*

| Helyzet                                        | Leírás                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1–55                                           | pTZ19R szekvenciák (Pharmacia)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 56–108                                         | I linker rc orientációban (STNT, NotI, SfiI, RsrII, HpaI, SnaBI, AatII)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 110–860                                        | E. coli gpt-szekvenciák rc orientációban. A gpt nyitott leolvasási keret a 860-as helyzetben egy rc TAC startkoddal kezdődik, és egy rc ATT stopkoddal ér véget a 403-as helyzetben                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 861–1338                                       | vacciniavírus p7.5 promoter szekvenciák rc orientációban                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1339–1344                                      | HpaI hely a T7 bakteriofág terminátor és a vacciniavírus p7.5 promoter között                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 1345–1488                                      | T7 bakteriofág terminátor szekvenciák rc orientációban (Studier és munkatársai)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 1489–1558                                      | Többszörös klónozóhely rc orientációban (SalI, translációs stopkodonok mind a három nyitott leolvasási keretre, StuI, XhoI, PstI, BamHI, SpeI, SacI, SmaI, EcoRI, NcoI)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 1559–2131                                      | Encephalomyocarditis vírus (EMC-vírus) 5'-nem transzlált régiójából származó szekvenciák rc orientációban                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 2132–2187                                      | T7 bakteriofág promoterszekvenciák rc orientációban                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 2190–2242                                      | II linker rc orientációban (SnaBI, HpaI, NotI, SfiI, STNT)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 2243–4701                                      | pTZ19R szekvenciák (Pharmacia)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <i>PTZselP–L2 és pselP–gpt–L2 szerkesztése</i> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 50                                             | A 0,6 kb hosszúságú ClaI–NcoI fragmenst (T7-promoter-EMC szekvenciát) egy szintetikus promoter fragmenssel helyettesítjük, amely az összeillesztett o–selPI oligonukleotidból (56. azonosítási számú szekvencia: 5'-CGA TAA AAA TTG AAA TTT TAT TTT TTT TTT TTG GAA TAT AAA TAA GGC CTC-3', 51-mer) és o–SelPII oligonukleotidból (57. azonosítási számú szekvencia: 5'-CAT GGA GGC CTT ATT TAT ATT CCA AAA AAA AAT AAA ATT TCA ATT TTT AT-3') áll. A kapott pTZselP–L2 közti plazmid még mindig tartalmazza a T7-terminátort és |

egy HpaI helyet, amelyet a következő klónozó lépésben eltávolítottunk, ezáltal egy vaccinia korai transzkripció stopszignált építettünk be, és a P7,5 promotor fragmens méretét 0,28-ról 0,18 kb-ra csökkentjük. A 239 bp hosszúságú Sall–NdeI fragmenst Sall–NdeI adapterrel helyettesítjük, amely az összeillesztett o–830 oligonukleotidból (58. azonosítási számú szekvencia: 5'-TCG ACT TTT TAT CA-3') és o–857 oligonukleotidból (59. azonosítási számú szekvencia: 5'-TAT GAT AAA AAC-3') áll. A kapott plazmidot pselP–gpt–L2-nek nevezzük (65. azonosítási számú szekvencia). Az így kapott plazmid további jellemzői az alábbi táblázatban láthatók.

| <i>pselP–gpt–L2 (3878 bp)</i><br>(65. azonosítási számú szekvencia) |                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Helyzet                                                             | Leírás                                                                                                                                                                                 |
| 1–55                                                                | pTZ19R szekvenciák (Pharmacia)                                                                                                                                                         |
| 56–108                                                              | I linker rc orientációban (5TNT, NotI, SfiI, RsrII, HpaI, SnaBI, AatII)                                                                                                                |
| 110–860                                                             | E. coli gpt-szekvenciák rc orientációban. A gpt nyitott leolvasási keret a 860-as helyzetben egy rc TAC startkodonnal kezdődik és egy rc ATT stopkodonnal ér véget a 403-as helyzetben |
| 861–1245                                                            | Vacciniavírus p7,5 promoterszekvenciák rc orientációban, amelyek a p7,5 belső NdeI helyével kezdődnek 1241-es helyzetben                                                               |
| 1246–1258                                                           | Vaccinaivírus korai transzkripció stopszignál rc orientációban egy NdeI hellyel (1245-ös helyzet) és egy Sall hellyel (1253-as helyzet) határolva                                      |
| 1259–1322                                                           | Többszörös klónozóhely rc orientációban (Sall, translációs stopkodonok mind a három nyitott leolvasási keretre, StuI, XhoI, PstI, BamHI, SpeI, SacI, SmaI, EcoRI, NcoI)                |
| 1323–1374                                                           | Vacciniavírus szintetikus korai/késői promotor rc orientációban, 1317-es helyzetben egy NcoI hellyel és 1370-es helyzetben egy ClaI hellyel határolva                                  |
| 1375–1414                                                           | II linker rc orientációban (SnaBI, HpaI, NotI, SfiI, 5TNT)                                                                                                                             |
| 1415–3878                                                           | pTZ19R szekvenciák (Pharmacia)                                                                                                                                                         |

#### *pSelP–gp160<sub>MN</sub> szerkesztése*

A p<sub>MN</sub>envI EcorI–PvuII fragmensét tartalmazó 3,1 kb hosszúságú env gént inzertáljuk az EcoRI-gyel és StuI-gyel hasított pselP–gpt–L2 plazmidba, így kapjuk a köztes pselP–gp160.1 plazmidot. A pselP–gp160 0,8 kb hosszúságú NcoI–NsiI fragmensét egy PCR technikával előállított 0,31 kb hosszúságú NcoI–NsiI fragmenssel helyettesítve kapjuk a kívánt pselP–gp160<sub>MN</sub> plazmidot (66. azonosítási számú szekvencia). A fenti plazmid további jellemzői a következő táblázatban láthatók.

#### *pselP–gp160<sub>MN</sub> (6474 bp)* (66. azonosítási számú szekvencia)

| Helyzet   | Leírás                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1–55      | pTZ19R szekvenciák (Pharmacia)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 56–108    | I linker rc orientációban (5TNT, SfiI, RsrII, HpaI, SnaBI, AatII)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 110–860   | E. coli gpt-szekvenciák rc orientációban. A gpt nyitott leolvasási keret 860-as helyzetben kezdődik az rc TAC startkodonnal és 403-as helyzetben ér véget a rc ATT stopkodonnal.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 861–1245  | Vacciniavírus p7,5 promoterszekvenciák rc orientációban, melyek az 1241-es helyzetben a p7,5 belső NdeI helyével kezdődnek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 1246–1258 | Vacciniavírus korai transzkripció stopjel rc orientációban (1245–1252-es hely), amelyet 1241-es helyzetben egy NdeI hely és 1253-as helyzetben egy Sall hely határol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 1259–3916 | HIV– <sub>MN</sub> env gén rc orientációban. Az ORF 3916-os helyzetben kezdődik egy rc TAC startkodonnal és 1348-as helyzetben ér véget egy rc ATT stopkodonnal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 3917–3970 | Vacciniavírus szintetikus korai/késői promotor rc orientációban, amelyet 3913-as helyzetben egy NcoI hely és 3966-os helyzetben egy ClaI hely határol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 3971–4015 | II linker rc orientációban (SnaBI, HpaI, NotI, SfiI, 5TNT)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4016–6474 | pTZ19R szekvenciák (Pharmacia)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 50        | A PCR-reakcióban primerként 40-mer o–NcoI-et (60. azonosítási számú szekvencia: 5'-GAG CAG AAG ACA GTG GCC ATG GCC GTG AAG GGG ATC AGG A-3') és 30-mer o–NsiI-et (61. azonosítási számú szekvencia: 5'-CAT AAA CTG ATT ATA TCC TCA TGC ATC TGT-3') alkalmazunk. További klónozásra a PCR terméket NcoI-gyel és NsiI-gyel hasítjuk.                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 45        | <i>vselP–gp160<sub>MNA</sub> és vselP–gp160<sub>MNB</sub> kiméravírusok szerkesztése</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 55        | A selP–gp160 és P7,5-gpt-génkzettákat tartalmazó HpaI fragmenst közvetlen molekuláris klónozással illesztjük (9.6 ábra) a WR 6/2 vacciniavírus törzs SmaI helyére [Moss és munkatársai: J. Virol. 40, 387–395 (1981)], amely egy erősen gyöngített vacciniavírus törzs [Buller és munkatársai: Nature 317, 803–815 (1985)]. A WR 6/2 vacciniavírust (lásd Moss és munkatársai fenti munkáját) egyetlen SmaI helyén hasítjuk, és egy 4,0 kb hosszúságú HpaI fragmenssel ligáljuk, amely a P7,5-gpt-gén és a selP–gp160 génkzettákat tartalmazza. A klónozóeljárást az 1. példában leírtak szerint végezzük. |
| 60        | Az így kapott vselP–gp160 <sub>MNA</sub> és vselP–gp160 <sub>MNB</sub> kiméravírusokat tisztítjuk, és tovább jellemezzük. A vselP–gp160 <sub>MNA</sub> vírusban a gp160 gén                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

ugyanazon irányban íródik át (balról jobbra) mint az inszerció helye körül felhalmozódó gének [az A51R nyitott leolvasási keret; Goebel és munkatársai, 179, 247–266 (1990)]. A vselP–gp160<sub>MN</sub>B vírusban a gp160 gén fordított irányban íródik át. Az in vivo pakolást a 3. példában leírtak szerint végezzük.

#### A kiméravírusok szerkezete

A kiméravírusok várt szerkezetének (9.7 ábra) megerősítésére Southern-blot-analízist végeztünk. A tisztított vírusok DNS-ét SalI-gyel hasítjuk, a fragmenseket agarózgélén elválasztjuk, nitrocellulóz szűrőre visszük, és vaccinia SalI fragmens próbával (pTZ–SalI) és gp160 gén próbával (pMNenvl) hibridizáljuk. A SalI fragmens próbával hibridizálva a vselP–gp160<sub>MN</sub>A esetben látható az előre várt 6,8 és 10,7 kb hosszúságú fragmens, a vselP–gp160<sub>MN</sub>B esetben pedig a várt 3,5 és 13,7 kb hosszúságú fragmens. A gp160 próbával ugyanezek a fragmensek láthatók, de a 10,7 kb hosszúságú fragmens a vselP–gp160<sub>MN</sub>A esetben és a 3,5 kb hosszúságú fragmens a vselP–gp160<sub>MN</sub>B esetben kevésbé intenzív jelet ad, mivel az egyes teljes fragmenseknek csak mintegy 400 bázispárja homológ a próbával.

Mivel a közvetlen klónozás tandem multimer szerkezetek kialakulását is eredményezi, a vírusok DNS-ét XbaI-gyel is hasítottuk, amely nem hasítja az inzertált DNS-t. A vad típusú XbaI fragmens hosszúsága 447 bp. A 3,8 kb hosszúságú inzert egy példányának beépülése egy 4,3 kb hosszúságú fragmenst eredményez. A multimer szerkezetekben a 4,3 kb fragmens mérete 3,8 kb növekményekkel növekedik.

#### vselP–gp160<sub>MN</sub>A és vselP–gp160<sub>MN</sub>B kiméravírusokkal végzett expressziós vizsgálatok

Az expresszió vizsgálatára Vero-sejteket alkalmaztunk. A sejtek szaporítását, kiméravírusokkal való fertőzését és a rekombináns gp160 protein tisztítását Barrett és munkatársai fent idézett eljárásával végeztük.

#### 10. példa

#### Humán S-proteint kódoló új kiméra-vacciniavírusok (vProtS) szerkesztése és a rekombináns S-protein expressziója

Ebben a példában mutatjuk be a rekombináns S-protein expresszálását kiméra-vacciniavírussal. A humán S-protein egy 70 kD méretű glikoprotein, amely a véralvadás szabályozásában játszik szerepet [DiScipio és munkatársai: Biochemistry, 18, 89–904 (1979)]. Az S-protein cDNS-ét és genomális DNS-ét már klónozták és jellemezték [Lundwall és munkatársa: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6716 (1986); Hoskins és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 349 (1987); Edenbrandt és munkatársai: Biochemistry, 29, 7861 (1990); Schmidt és munkatársai: Biochemistry, 29, 7845 (1990)].

A humán S-proteint – amely egyébként 70 kD méretű proteinként a májban és az endoteliális sejtekben szintetizálódik (DiScipio és munkatársai fent idézett munkája) – humán 293 és hörcsög AV12–664 sejtekből származó permanens sejtvonalakban (adenovírus transzformált sejtvonalak) expresszálták legfeljebb 7 µg/10<sup>6</sup> sejt/nap koncentrációban [Grinnell és munkatársai: Blood 76, 2546 (1990)], vagy C127 egér sejt/pa-

pilloma vírusrendszerben, ahol hasonló expressziós szintek érhetők el [Malm és munkatársai: Eur. J. Biochem., 187, 737 (1990)]. Az utóbbi sejtekből származó protein nagyobb, mint a plazma eredetű S-protein, valószínűleg egy rendellenes glikozilezés következtében.

Az S-protein találmány szerinti expresszálására egy kettős gén kazettát alkalmazunk, amely a humán vérfaktor S-proteint kódoló komplementer DNS-ből és a gpt-génből áll, mindkettő egy vaccinia promotor szabályozása alatt. Ezt a kazettát az egyetlen NotI helyre klónozzuk, és szárnyaspoxvírus helpervírussal fertőzött emlőssejtekben pakoljuk. A humán S-protein fertőzött Vero sejtekben 4–6 µg/10<sup>6</sup> sejt koncentrációban expresszálódik.

Az S-protein vacciniavírus általi optimális expressziójára alkalmas sejtek vizsgálatára öt különböző gazdasejtvonalat alkalmaztunk, ezek a WI 38 (humán embrionális tüdőfibroblaszt), CV-1 és Vero (majom vesesejtek), Chang-májsejt és SK Hep1. Az S-protein számos módszerrel nem volt megkülönböztethető a plazmából származó S-proteintól, a fenti sejtvonal fertőzött sejtjeiből származó rekombináns anyag ugyanazt az elektroforetikus vándorlási képet és ugyanazt a kromatográfiás elúciós profilt mutatta, mint a plazmából származó S-protein. Ez jelzi, hogy fenti komplex glikoprotein helyes poszttranszlációs módosítása végbement. Az eljárást részleteiben alább ismertetjük.

#### pN2–gptaProtS plazmid szerkesztése

A humán S-proteint kódoló cDNS-t tartalmazó pBluescript–ProtS plazmidból (amelyet R. T. A. McGilivray bocsátott rendelkezésünkre) készített egyszálú DNS-t alkalmaztuk az S-proteint kódoló régió transzlációs startkodonjának környezetében lévő régió mutagenézisére egy NcoI helyre (CCATGG). Az oProtS1 mutagén primer (68. azonosítási számú szekvencia) szekvenciája 5'-ACC CAG GAC CGC CAT GGC GAA GCG CGC-3'; a mutagenézist az Amersham, Inc. által előírt protokoll szerint hajtottuk végre. A mutáció a szignálpeptidben megy végbe úgy, hogy a második aminosav argininről alaninra cserélődik (10.1 ábra B része és 77. és 79. azonosítási számú szekvenciák). Ez egy NcoI helyet vezet be a szekvenciába, amely a további klónozáshoz szükséges, és az ATG startkodon a transzlációhoz optimális helyzetbe hozza. Ez javíthatja az S-protein kiválasztását.

Ezután az S-protein cDNS-t NcoI–NotI fragmenseként kivágjuk, és pTKgpt–selP vaccinia inszerció plazmidba (Falkner és munkatársai fent idézett munkája) inzertáljuk, ez a plazmid egy erős szintetikus vaccinia promotert szolgáltat. Ezután a promotor–S-proteingén-kazettát BglII–NotI fragmenseként kivágjuk, és a pN2–gpta plazmidba (1. példa) inzertáljuk, így kapjuk a pN2–gptaProtS plazmidot (67. azonosítási számú szekvencia). A fenti szerkezet további jellemzői az alábbi táblázatból láthatók.

#### pN2–gptaProtS (6811 bp)

#### (67. azonosítási számú szekvencia)

| Helyzet | Leírás                                    |
|---------|-------------------------------------------|
| 1–2217  | Bluescript II SK szekvenciák (Stratagene) |

## (a táblázat folytatása)

| Helyzet   | Leírás                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2218–2225 | NotI hely (1)                                                                                                                                                                                                                  |
| 2226–4938 | ProtS szekvenciák rc orientációban. A nyitott leolvasási keretek a 4938-as helyzetben kezdődnek egy rc TAC startkodonnal és 2910-es helyzetben fejeződnek be egy rc ATT stopkodonnal                                           |
| 4939–4992 | Vacciniavírus szintetikus korai/késői promoter rc orientációban, amelyet 4935-ös helyzetben egy NcoI hely és 4987–4992-es helyzetben egy fuzionált BglII/BamHI hely határol. Az NcoI hely tartalmazza a ProtS TAC startkodont. |
| 4993–5493 | Vacciniavírus p7,5 promoterszekvenciák                                                                                                                                                                                         |
| 5494–6127 | E. coli gpt-szekvenciák. Az ORF az 5494-es helyzetben ATG startkodonnal kezdődik és 5950-es helyzetben egy TAA stopkodonnal fejeződik be                                                                                       |
| 6128–6235 | NotI hely (2)                                                                                                                                                                                                                  |
| 6236–6811 | Bluescript II SK szekvenciák (Stratagene)                                                                                                                                                                                      |

Ebben a plazmidban a vacciniavírus P7,5 promoter által szabályozott gpt-gén és az S-protein cDNS eltérően van átírva, és NotI helyekkel van határolva.

*vProtS előállítására humán S-protein cDNB inzertálásával vacciniavírus egyetlen NotI helyére*

A gpt- és S-protein-kazettákat tartalmazó NotI fragmenst a vacciniavektor-karokkal ligáljuk, és FPV-vel fertőzött emlős CV-1-sejtekbe transzfektáljuk. Csak a pakolt vacciniavírus szaporodik ilyen körülmények között. Közelebről 1 µg vad típusú vacciniavírus DNS-t NotI-gyel hasítunk, az enzimet 30 percen keresztül 65 °C-on melegítve hővel inaktíváljuk. A vektort egy éjszakán keresztül ligáljuk 1 µg 3,8 kb hosszúságú gpt/S-protein gén kazettával (amelyet a pN2–gpt–ProtS plazmidból NotI fragmenként hasítunk ki) 30 µl elegyben, 15 egység T4 DNS-ligáz alkalmazásával.

Az 5 napos inkubálással előállított nyersvírus törzstenyészetet mikofenolsav (MPA) jelenlétében és annak távollétében titráljuk. Ezzel az eljárással különböztethető meg a kiméra a visszaligált vad típusú vírustól. MPA jelenlétében  $4 \times 10^4$ , anélkül  $6 \times 10^5$  pfu/ $10^6$  gazdasejt titert kapunk. A vírusplakkoknak mintegy 6–7%-a kiméravírus. A gpt-pozitív izolátumok közül tízet plakk-tisztítottunk kétszer, kis mennyiségű nyers törzstenyészetet készítettünk, és CV-1-sejtek fertőzésére alkalmaztuk. Kipreparáltuk az összes DNS-t, SacI és NotI restrikciós enzimekkel hasítottuk, és Southern-blot-analízissel analizáltuk (10.2 ábra). A klónozott SacI–I fragmenssel (pTZ–SacI plazmid, 4. példa) hidridizált SacI emésztési termék lehetővé tette az inzertált DNS orientációjának meghatározását, mivel a SacI az inzerteket aszimmetrikusan hasítja. Az inzertek mind a 10 izolátumban „a” orientációban vannak (6.3 és 4.6 kb hosz-

szúságú fragmensek, lásd a 10.2 ábra A és C részét), jelezvén, hogy ez a konfiguráció sokkal előnyösebb. Az NotI fragmenseket az S-protein-próbával hibridizáltuk. Ebben az esetben a 3,8 kb hosszúságú NotI génkazetta szabadult fel (10.2 ábra B része).

*Humán S-protein expressziója kiméra-vacciniavírussal*

A gpt-pozitív kiméravírusokból nyers törzstenyészeteket készítettünk, és különféle emlőssejtvonalak fertőzésére alkalmaztuk.  $5 \times 10^6$  sejtet tartalmazó egyrétegű sejtstenyészeteket 0,1 pfu/sejttel fertőztünk, 50 µg/ml K-vitaminnal kiegészített szérumban (DMEM), és 72 órán keresztül inkubáltuk. A felülúszókat összegyűjtöttük, és az S-protein antigént ELISA-tesztkészlet alkalmazásával (Boehringer Mannheim, NSZK, a készlet száma: 1360264) meghatároztuk. Az elhasználandó S-protein mennyiségét az 1. táblázatban milliegyységben adjuk meg (1 egység 25 µg S-proteinnek felel meg).

Vero-sejtekből származó 10 µl felülúszót is analizáltunk Western-blottal, standardként 50 ng humán plazmából származó S-protein és egy „hu Prot S”-re specifikus egér poliklonális szérum (Axell) alkalmazásával (10.3 ábra). A blotokat lúgos foszfátazzal konjugált kecske-antigén poliklonális szérummal (Dakopatts) és szubsztrátként NBT/BCIP-vel festettük.

A rekombináns S-protein tisztítását sejtenyészetek felülúszójából Grinnell és munkatársai (1990) módszere szerint végeztük.

10.1 táblázat

| Sejtvonal | ATCC szám | Milliegyység, huProtS/ $10^6$ sejt |
|-----------|-----------|------------------------------------|
| SK Hep1   | (HTB52)   | 750                                |
| Vero      | (CCL 81)  | 127                                |
| Chang máj | (CCL 13)  | 135                                |
| CV-1      | (CCL 70)  | 450                                |
| WI 38     | (CCL 75)  | 440                                |

## 11. példa

*Humán IX faktort kódoló kiméra-vacciniavírusok előállítása és rekombináns IX faktor expressziója*

Egy kettős gén kazettát – amely a humán IX vérfaktort kódoló komplementer DNS-t és a gpt-gént tartalmazza, mindkettőt egy vaccinia promoter szabályozása alatt – a vacciniavírus WR-genom egyetlen NotI helyére klónozzuk, és helper-szárnypoxvírussal fertőzött emlőssejtekben pakoljuk.

A humán IX faktort számos sejttípusban expresszáljuk.

A humán IX véralvadási faktor egy 56 kD méretű glikoprotein, amely a véralvadás szabályozásában játszik szerepet. Ez a véralvadási faktor komplex poszttranszlációs módosításokon megy keresztül, ezek: az első 12 glutaminsav-maradék K-vitamintól függő karboxilezése, glikozilezés, aszparaginsav β-hidroxilezése és a protein aminoterminális átalakítása [Davie E. W., „The Blood Coagulation Factors: Their cDNAs, Genes and Expression”, Hemostasis and Thrombosis, szerkesztő Colman, R. W., Hirsh, J. Marder, V. J. and

Salzman, E. W. J. B. Lippincott Co. (1987)]. A B hemo-filiát és az X kromoszómával kapcsolatos vérzési rendellenességet a IX faktor mutációja okozza. A hemo-filiás betegeket napjainkban plazmából származó IX faktor helyettesítéssel kezelik.

A cDNS-t és a IX faktor genomális DNS-ét („FIX”) klónozzuk és jellemezzük, és az FIX-et állandó sejtvonalakban expresszáljuk [Busby és munkatársai: *Nature*, 316, 271 (1985); Kaufman és munkatársai: *J. Biol. Chem.* 261, 9622 (1986); Balland és munkatársai: *Eur. J. Biochem.*, 172, 565 (1988) és Lin és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, 265, 144 (1990)]. A IX faktor vaccinia rekombinánsokban való expressziója szintén ismert [de la Salle és munkatársai: *Nature*, 316, 268 (1985)].

#### Plazmidok szerkesztése

##### pN2gpta-FIX szerkesztése

Az FIX cDNS-t (amelyet R. T. A. MacGillivray bocsátott rendelkezésünkre) pBluescript-FIX plazmidból EcoRI-gyel vágják ki és EcoRI-gyel linearizált pTM3 plazmiddal ligálják. [Moss és munkatársai: *Nature*, 348, 91 (1990)]. Az FIX inzertet helyes orientációban tartalmazó rekombináns plazmidból izoláljuk az egyes szálú DNS-t, és NcoI helyet (CCATGG) vezetünk be az FIX ATG startkodon közelébe oligonukleotid mediálta hely-irányított mutagenézissel, oFIX.1 oligonukleotidot (71. azonosítási számú szekvencia: 5'-TCA TGT TCA CGS GCT CCA TGG CCG CGG CCG CAC C-3') és kereskedelmi forgalomban kapható mutagenézis készletet (Amersham, Inc., PPN 1523. készlet) alkalmazva. A vektort és az FIX NcoI helyeket fuzionáljuk, az inzertált DNS-t NcoI-gyel végzett hasítással izoláljuk, és NcoI/NotI-gyel hasított pTKgpt-selP vektorral ligáljuk (Falkner és munkatársai fent idézett munkája). Ebből a plazmidból BglII-vel és NotI-gyel kihalásítjuk a promoter/FIX kazettát, és BamHI/NotI-gyel linearizált pN2-gpta vektorral (1. példa) ligáljuk. Az így kapott szerkezetből izoláljuk az NotI kazettát, amely tartalmazza az FIX cDNS-t (a selP promoter szabályozása alatt) és a gpt-gént (a vaccinia P7,5 promoter szabályozása alatt), és ezt alkalmazzuk in vitro molekuláris klónozásra és pakolásra a 10. példában leírtak szerint. A fenti plazmid további jellemzői az alábbi táblázatból láthatók.

##### pN2gpta-FIX (5532bp)

(72. azonosítási számú szekvencia)

| Helyzet   | Leírás                                                                                                                                                                      |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1–2217    | Bluescript II SK szekvenciák (Stratagene)                                                                                                                                   |
| 2218–2225 | NotI hely (1)                                                                                                                                                               |
| 2226–3659 | FIX szekvencia rc orientációban. A nyitott leolvasási keret a 3659-es helyzetben kezdődik egy rc TAC startkoddal, és 2276-os helyzetben ér véget egy rc ATT stopkoddal      |
| 3660–3713 | Vacciniavírus szintetikus korai/késői promoter rc orientációban, a 3656-os helyzetben egy NcoI hellyel határolva és 3708–3713-as helyzetben BglII/BamHI hellyel fuzionálva. |

#### Helyzet

#### Leírás

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3714–4214 | Az NcoI hely tartalmazza az FIX TAC startkodont                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 5         | Vacciniavírus P7,5 promoter-szekvenciák                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4215–4848 | E. coli gpt-szekvenciák. Az ORF 4215-ös helyzetben egy ATG startkoddal kezdődik és 4671-es helyzetben egy TAA stopkoddal ér véget                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 10        | NotI hely (2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 4849–4856 | Bluescript II SK szekvenciák (Stratagene)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 4857–5532 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 15        | <i>Humán IX faktort kódoló cDNS-inzertálása vacciniavírus egyetlen NotI helyére</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|           | A IX faktor cDNS-vacciniavírusba való inzertálását megelőzően ezt a cDNS-t a pN2-gpta plazmidba inzertáljuk, így kapjuk a pN2gpta-FIX plazmidot (11.1 ábra A része, 72. azonosítási számú szekvencia).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 20        | A szintetikus vaccinia promoter és a IX faktort kódoló régió közötti optimális szekvenciakapcsolat biztosítására a IX faktor 5'-nem transzlátált régióját a IX faktor startkodonjával, egy új NcoI hely kialakításával és ezen NcoI hely és a promoter által biztosított NcoI hely fúziójával töröljük. Ez a mutáció egy mutált szignálpeptidet eredményez (11.1 ábra B része). A vad típusú IX faktorban a szignálpeptid második aminosavja egy glutaminmaradék, míg a pN2gpta-FIX-ben a második aminosav egy glutaminsav-maradék.                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 25        | A gpt-gén és a IX faktor génkazettákat tartalmazó NotI fragmenst vacciniavektor-karokkal ligáljuk, és FPV-vel fertőzött emlős CV-1-sejtekbe transzfektáljuk. Ilyen körülmények között csak a pakolt vacciniavírus szaporodik. Az 5 napos inkubálással kapott nyersvírus törzsszuspenziókat mikofenolsav (MPA) jelenlétében és távollétében titráljuk. Ezzel az eljárással megkülönböztetjük a kimérákat a visszaligált vad típusú vírustól. MPA-val $5 \times 10^4$ , MPA nélkül $5 \times 10^6$ pfu/ $10^6$ gazdasejt titert kapunk. Ebben a példában a virális plakkoknak mintegy 1%-a kiméravírus. A gpt-pozitív izolátumok közül tízet kétszer plakktisztítunk, majd kis mennyiségű nyers törzstenyészeteket készítünk belőlük, és CV-1-sejtek fertőzésére alkalmazzuk. A megfelelő vírusizolátummal fertőzött sejtenyészetek közül |
| 30        | nyolcból preparáljuk a teljes DNS-t, SfuI, NdeI és NotI restrikciós enzimekkel emésztjük, és Southern-blot-analízissel analizáljuk.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 35        | A IX faktor próbával hibridizált SfuI emésztési termék lehetővé teszi az inzertált DNS orientációjának meghatározását, mivel az SfuI az inzertet aszimmetrikusan hasítja. Mind a nyolc izolátumban „a” orientációban van az inzert (6,3 és 4,6 kb hosszúságú fragmensek, lásd a 11.2 ábrát), jelezvén, hogy ez a konfiguráció előnyösebb. Az NdeI (NotI) fragmenseket szintén hibridizáljuk a IX faktorpróbával. Ebben az esetben egy 656 kb hosszúságú fragmens (a 3,8 kb NotI gén kazetta) válik szabaddá, ami alátámasztja a várt szerkezetet.                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 40        | <i>Humán IX faktor expressziója</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 45        | Nyolc plakvizolátumból külön-külön nyers törzstenyészeteket készítünk, és ezeket alkalmazzuk különféle                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 50        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 55        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 60        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

emlős sejtvonalak fertőzésére. 10 cm-es Petri-csészékben lévő  $5 \times 10^6$  sejtet fertőzünk 0,1 pfu/sejttel 50 µg/ml K-vitamint tartalmazó szérumentes tápközeg (DMEM) jelenlétében. A fertőzött sejteket 72 órán keresztül inkubáljuk, amíg a sejtek kezdenek elválni a Petri-csésze aljától. A felülúszót összegyűjtjük, és a sejtörmelékét centrifugálással eltávolítjuk, majd az FIX mennyiségeket ELISA-módszerrel (Boehringer Mannheim, NSZK, a készlet száma: 1360299) meghatározzuk. A IX faktor FIX antigénjének mennyiségeit a 11.1 táblázatban adjuk meg.

Másik kísérletben Vero-sejtekből származó 10 µl felülúszót Western-blottal analizálunk, standardként 50 µg humán plazmából származó huFIX-et és egy huFIX-re specifikus egér poliklonális szérumot (Axell) alkalmazva. A blotokat lúgos foszfátazzal konjugált kecske-antigén poliklonális szérummal (Dakopatts) és szubsztrátként NBT/BCIP alkalmazásával festjük. Amint az a 11.3 ábrából látható, a rekombináns anyag széles sávként mozog, a standard plazmából származó IX faktorhoz hasonlóan. A Vero-sejtekből származó, részlegesen tisztított IX faktorról végzett alvadási vizsgálatok azt mutatják, hogy az anyagnak mintegy 50%-a hatásos IX faktor. Az 5. számú vírusizolátumot (amelyet vFIX#5-nek nevezünk) nagy léptékben tenyésztjük, és ezt alkalmazzuk a további kísérletekben. Ugyanúgy, mint az S-protein kimeravírusok esetében (10. példa), a IX faktort expresszáló kimerák is az egyik előnyös orientációban tartalmazzák az inzerteket.

A kérdéses génről a protein (IX faktor és S-protein) transzkripciója jobbról balra történt, azaz ugyanazon irányban, mint az NotI hely körül lévő génekről. Ezért úgy tűnik, hogy az erősen átíródo egységeknek az előnyös transzkripció irányban kell elhelyezkedniük, amikor az NotI helyre klónozzuk. Az inzertet a fenti konfigurációban tartalmazó vírusok igen előnyösek, és ezek mutatják a legjobb szaporodási tulajdonságokat. A másik génkazetta, a P7,5 gpt-gén transzkripciójának iránya balról jobbra volt. Ezért a P7,5 promotor szegmens fordított ismétlődő konfigurációban van a 7,5 kD-os proteint kódoló közeli endogén génhez viszonyítva, azaz a várt stabil konfiguráció az előnyös. Mivel nem találtunk fordított orientációval rendelkező kimerákat, a „b” orientáció valószínűleg instabil. A fenti génkazetták „b”-orientációjú inszerciója in vivo rekombinációval nem sikerült volna, ami ahhoz a téves feltételezéshez vezethet, hogy az NotI intergénrégió esszenciális a vírusnövekedéshez. Ez a helyzet a közvetlen klónozás egyik előnyét bizonyítja: csak a megengedett szerkezetek képződnek.

Egyszerű, kisméretű génkazetták inszerciójával mindkét orientáció és multimerek is keletkeznek (1. példa), míg komplex génkazetták inszerciójával (eltérően átíródo kettős gén kazetták, amelyek belső génekkel, például P7,5 promotor szegmenssel homológiát mutatnak) az előnyös szerkezetek alakulnak ki.

Amikor a sejteket a IX faktor optimális expressziója szempontjából vizsgáltuk, azt találtuk, hogy a CV-1 és SK Hep1 sejtek mutatták a legmagasabb antigénszinteket. A CV-1-sejtekből származó anyag rendelkezett

a legnagyobb véralvasztó aktivitással (11.1 táblázat), jelezvén, hogy ez a sejtvonal rendelkezik a megfelelő posztranszlációs módosítórendszerrel. A IX faktort korábban hagyományos vaccinia expressziós rendszerekben expresszálták P7,5 promoter és HepG2 és BHK sejtek (de la Salle és munkatársai, 1985) alkalmazásával. A jobb szaporodási jellemzőkkel rendelkező sejtvonalokról, például a Vero- és CV-1-sejtekről kimutattuk, hogy jelen vírusokkal magasabb expressziós szinteket mutatnak a jobb promoterek és módszerek következtében. Ezenkívül úgy tűnik, hogy a IX faktor cDNS 5'-nem transzlatált régiójának törlése és a szignálpeptid módosítása pozitív hatást fejt ki az expressziós szintekre és a szekrécióra.

### 11.1 táblázat

A IX faktor expressziója különböző sejtvonalakban

| Sejtvonal | ATCC szám | Antigén milliegység/<br>10 <sup>6</sup> sejt* | Aktivitás milliegység/<br>10 <sup>6</sup> sejt* | Arány (%) |
|-----------|-----------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
| SK Hep1   | (HTB52)   | 810                                           | 183                                             | 22,5      |
| Vero      | (CCL81)   | 500                                           | 282                                             | 56,4      |
| Chang máj | (CCL13)   | 190                                           | 100                                             | 52,6      |
| CV-1      | (CCL70)   | 850                                           | 1290                                            | 151,8     |
| RK13      | (CCL37)   | 300                                           | 460                                             | 153,3     |

\* 1 egység 5 µg FIX/ml humán plazmának felel meg.

### 12. példa

*f-envIIIB kiméra-szárnyaspoxyvírus szerkesztése és rekombináns HIVIIIB burokproteinek expressziója csirkeembrió-fibroblasztokban*

Barrett és munkatársai ismertették a gp160 nagy léptékű előállítását vacciniavírus-Vero-sejt expressziós rendszerben (1989). Mivel a vacciniavírus mégiscsak patogén számos meleg vérű számára (beleértve az emlősöket is), míg a szárnyaspoxyvírus a madárfajokra nézve gazdaspecifikus, egy madár-poxyvíruson alapuló expressziós rendszert fejlesztettünk ki (07/734 741 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés és annak folytatólagos bejelentése). Kiméra-szárnyaspoxyvírusokat is szerkesztettek közvetlen molekuláris klónozással a HIV-1 IIIB izolátum burokgénjének expresszálására (Ratner és munkatársai, 1985). Ebben a rekombináns vírusban az env gén egy erős, szintetikus késői promoter szabályozása alatt áll. A burok-glikoproteinek előállítására a kiméra-szárnyaspoxyvírust alkalmazták csirkeembrió-aggregátum sejtenyészetek fertőzésére (Mundt és munkatársai, PCT/WO 91/709 937).

*f-envIIIB kiméra-szárnyaspoxyvírus szerkesztése és szerkezete*

Az *f-envIIIB* megszerkesztésére (12.1 ábra) a pN2gpt-gp160 plazmidből (5. példa) NotI fragmens formájában kivágjuk a P7,5 promoter/gpt génből és az S4-promoter/gp160 génből álló kettős gén kazettát. Ezt a kazettát ligáljuk az *f-TK2a* szárnyaspoxyvírus NotI-gyel hasított genomális DNS-ével (2. példa) és a

kiméravírust az anyagok és módszerek ismertetésében leírt módon izoláljuk. A 12 különböző plakkal fertőzött csirkeembrió-fibroblasztból származó összes DNS-t SsplI-gyel emésztettük, és Southern-blottal tovább analizáltuk, hibridizálásra próbaként egy izolált gp160 fragmenst alkalmaztunk (12.2 ábra A része). 11 esetben megtaláltuk a várt 3,7, 1,0 és 0,8 kb hosszúságú fragmenseket, jelezvén, hogy a gp160 gén „b” orientációban integrálódott (12.2 ábra B része). 1 vírusizolátum, az f-LF2e nem hibridizált a gp160 próbával.

Az a tény, hogy az inzert egy előnyös orientációban van, arra a lehetőségre utal, hogy a „b” orientációjú vírus szaporodása előnyös az „a” orientációval szemben, az „a” orientáció még instabil is lehet. A közvetlen klónozási módszer egyik előnye lehet az, hogy a vírusvektornak lehetőséget ad a legjobb orientáció kiválasztására.

#### *f-envIIB kiméravírussal végzett expressziós vizsgálatok*

Az expressziós vizsgálatokat csirkeembrió-fibroblasztokon (CEF) végeztük. A CEF összefüggő egyrétegű tenyészetét 0,1 pfu/sejt mennyiségű, 5 napos nyersvírus törzsszuspenziókkal fertőztük. 10%-os poliakrilamid-géleken elválasztottuk az összes celluláris proteint, és nitrocellulóz szűrőkre vive az anyagok és módszerek részben leírtak szerint analizáltuk tovább. A gp160, gp120 és gp41 expresszióját bemutató Western-blotok a 12.3 és 12.4 ábrán láthatók. Az f-LF2e kivételével az összes vírusizolátum indukálta az env glikoproteinek expresszióját. Az f-LF2e vírus a Southern-blot-analízis szerint is negatív volt, így nem hordozza a gp160 génszekvenciákat.

#### *f-envIIB szerkesztése*

Az f-TK2a gazdavírusvektor (2. példa) DNS-ének 2 µg-ját NotI-gyel hasítjuk, és 500 ng P7,5 promoter/gpt génből és S4 promoter/gp160 génből álló génkazettával ligáljuk. A ligálást 20 µl térfogatban, 4 napon keresztül, 12 °C-on hajtjuk végre, és 5 egység ligázt alkalmazunk. A ligációs elegyet 0,5 pfu/sejt HP2-vel fertőzött 6×10<sup>6</sup> CEF-be transzfektáljuk (a HP2 a HP1.441 plakk tisztításával kapott szárnyaspoxi-

rus-izolátum). 5 napos inkubálással egy nyers törzsszuspenziót állítunk elő (végtérfogat 1 ml), amelyet felnagyítunk. A nyers törzsszuspenziót CEF-en titráljuk 6 rezervoáros lemezekben, és 5 napon keresztül gpt-szelekció alatt (25 µg/ml mikofenolsav, 125 µg xantin) tenyésztjük. Azokat a sejteket, amelyeken a minimális hígítás látható citopátiás hatást eredményezett összegyűjtjük, és ugyanezzel a módszerrel kétszer felnagyítjuk. A második nagyítás után kapott nyers törzsszuspenziót CEF-sejteken titráljuk gpt-szelekciós nyomás alkalmazásával, és 12 különálló plakkot (f-LF2a-1) veszünk le.

#### *gp160 Western-blotjai*

A Western-blot-analízist lényegében Towbin és munkatársai fent idézett módszere szerint hajtjuk végre. A gp160/gp120 detektálására első antitestként egy egér monoklonális anti-HIV-gp120 antitestet (Du Pont, Inc., száma: NEA9305) alkalmaztunk 1:500 hígításban. A gp41 detektálására humán anti-HIV-gp41 3D6 Mab-t (H. Katinger, Universität für Bodenkultur, Inst. für Angewandte Mikrobiologie) alkalmaztunk 1:500 hígításban. A második antitest egy kecske-antigén IgG (H+L) lúgos foszfátázzal kapcsolva (BioRad, Inc., száma: 170-6520), amelyet 1:1000 hígításban alkalmaztunk. A reagensek (BCIP és NBT) és a protokollok a Promega, Inc.-től származtak.

Az azonosítási számokkal definiált szekvenciákat az alábbiakban ismertetjük.

#### *SZEKVENCIALISTA*

##### *1. azonosítási számú szekvencia*

##### *(i) Szekvencia jellemzői:*

- (A) hosszúság: 48 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid

##### *(vii) Közvetlen forrás:*

- (B) klón: pN2

##### *(xi) Szekvencia leírása:*

**TCAAGCTTAT CGATACCGTC GCGGCCGCGA CCTCGAGGGG GGGCCCGG 48**

##### *2. azonosítási számú szekvencia*

##### *(i) Szekvencia jellemzői:*

- (A) hosszúság: 1133 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris

##### *(ii) Molekula típusa:*

- (A) Megnevezés: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid

##### *(vii) Közvetlen forrás:*

- (B) klón: pN2-gpta

##### *(xi) Szekvencia leírása:*

**CTAGAACTAG TGGATCCCC AACTTAAGGG TACCGCCTCG ACATCTATAT ACTATATAGT 60**  
**AATACCAATA CTCAAGACTA CGAACTGAT ACAATCTCTT ATCATGTGGG TAATGTTCTC 120**  
**GATGTCGAAT AGCCATATGC CGGTAGTTGC GATATACATA AACTGATCAC TAATTCCAAA 180**  
**CCCACCCGCT TTTTATAGTA AGTTTTTTCAC CCATAAATAA TAAATACAAT AATTAAATTC 240**  
**TCGTAAAAGT AGAAAATATA TTCTAATTTA TTGCACGGTA AGGAAGTAGA ATCATAAAGA 300**  
**ACAGTGACGG ATGATCCCCA AGCTTGGACA CAAGACAGGC TTGCGAGATA TGTTTGAGAA 360**

TACCACTTTA TCCCGCGTCA GGGAGAGGCA GTGCGTAAAA AGACGCGGAC TCATGTGAAA 420  
TACTGGTTTT TAGTGCGCCA GATCTCTATA ATCTCGCGCA ACCTATTTTC CCCTCGAACA 480  
CTTTTTAAGC CGTAGATAAA CAGGCTGGGA CACTTCACAT GAGCGAAAAA TACATCGTCA 540  
CCTGGGACAT GTTGCGAGATC CATGCACGTA AACTCGCAAG CCGACTGATG CCTTCTGAAC 600  
AATGGAAAGG CATTATTGCC GTAAGCCGTG GCGGTCTGGT ACCGGGTGCG TTAGTGCGC 660  
GTGAACTGGG TATTCGTCAT GTCGATACCG TTTGTATTTT CAGCTACGAT CACGACAACC 720  
AGCGCGAGCT TAAAGTGCTG AAACGCGCAG AAGGCGATGG CGAAGGCTTC ATCGTTATTG 780  
ATGACCTGGT GGATACCGGT GGTACTGCGG TTGCGATTCT TGAAATGTAT CCAAAGCGC 840  
ACTTTGTCAC CATCTTCGCA AAACCGGCTG GTCGTCCGCT GGTGATGAC TATGTTGTTG 900  
ATATCCCGCA AGATACCTGG ATTGAACAGC CGTGGGATAT GGGCGTCGTA TTCGTCCCGC 960  
CAATCTCCGG TCGCTAATCT TTTCAACGCC TGGCACTGCC GGGCGTTGTT CTTTTTAACT 1020  
TCAGGCGGGT TACAATAGTT TCCAGTAAGT ATTCTGGAGG CTGCATCCAT GACACAGGCA 1080  
AACCTGAGCG AAACCCTGTT CAAACCCCGC TTTGGGCTGC AGGAATTCGA TAT 1133

### 3. azonosítási számú szekvencia

#### (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 1133 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris

#### (ii) Molekula típusa:

25

#### (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
szintetikus DNS-oligonukleotid

#### (vii) Közvetlen forrás:

#### (B) klón:

pN2-gptb

#### (xi) Szekvencia leírása:

CTAGAACTAG TGGATCCCC AAAGCGGGT TTGAACAGGG TTTCGCTCAG GTTTGCCTGT 60  
GTCATGGATG CAGCCTCCAG AATACTTACT GGAACTATT GTAACCCGCC TGAAGTTAAA 120  
AAGAACAACG CCCGGCAGTG CCAGGCGTTG AAAAGATTAG CGACCGGAGA TTGGCGGGAC 180  
GAATACGACG CCCATATCCC ACGGCTGTTC AATCCAGGTA TCTTGCGGGA TATCAACAAC 240  
ATAGTCATCA ACCAGCGGAC GACCAGCCGG TTTTGCGAAG ATGGTGACAA AGTGCGCTTT 300  
TGGATACATT TCACGAATCG CAACCGCAGT ACCACCGGTA TCCACCAGGT CATCAATAAC 360  
GATGAAGCCT TCGCCATCGC CTTCTGCGCG TTTCAGCACT TTAAGCTCGC GCTGGTTGTC 420  
GTGATCGTAG CTGGAAATAC AAACGGTATC GACATGACGA ATACCCAGTT CACGCGCCAG 480  
TAACGCACCC GGTACCAGAC CGCCACGGCT TACGGCAATA ATGCCTTTCC ATTGTTTACA 540  
AGGCATCAGT CGGCTTGCGA GTTTACGTGC ATGGATCTGC AACATGTCCC AGGTGACGAT 600  
GTATTTTTTCG CTCATGTGAA GTGTCCCAGC CTGTTTATCT ACGGCTTAAA AAGTGTTTCA 660  
GGGGAAAATA GGTGCGCGA GATTATAGAG ATCTGGCGCA CTAAAAACCA GTATTTTACA 720  
TGAGTCCGCG TCTTTTTTACG CACTGCCCTCT CCCTGACGCG GGATAAAGTG GTATTCTCAA 780  
ACATATCTCG CAAGCCTGTC TTGTGTCCAA GCTTGGGGAT CATCCGTCAC TGTCTTTTAT 840  
GATTCTACTT CCTTACCGTG CAATAAATTA GAATATATTT TCTACTTTTA CGAGAAATTA 900  
ATTATTGTAT TTATTATTTA TGGGTGAAAA ACTTACTATA AAAAGCGGGT GGGTTTGGAA 960  
TTAGTGATCA GTTTATGTAT ATCGCAACTA CCGGCATATG GCTATTCGAC ATCGAGAACA 1020

**TTACCCACAT GATAAGAGAT TGTATCAGTT TCGTAGTCTT GAGTATTGGT ATTACTATAT 1080**

**AGTATATAGA TGTCGAGGCG GTACCCTTAA GTTGGGCTGC AGGAATTCGA TAT 1133**

*4. azonosítási számú szekvencia*

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 66 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris

5

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
szintetikus DNS-oligonuk-  
leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pHindJ-2

(xi) Szekvencia leírása:

**CGCATTTTCT AACGTGATGG GATCCGTTAA CTCGCGAGAA TTCTGTAGAA AGTGTACAT 60**

**CGACTC 66**

*5. azonosítási számú szekvencia*

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 127 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris

15

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
szintetikus DNS-oligonuk-  
leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pHindJ-3

(xi) Szekvencia leírása:

**CGCATTTTCT AACGTGATGG GATCCGGCCG GCTAGGCCGC GGCCGCCCCG GTTTTTATCT 60**

**CGAGACAAAA AGACGGACCG GGCCCGGCCA TATAGGCCCA ATTCTGTAGA AAGTGTTACA 120**

**TCGACTC 127**

*6. azonosítási számú szekvencia*

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 115 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris

30

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
szintetikus DNS-oligonuk-  
leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pAO

(xi) Szekvencia leírása:

**AGGGAACAAA AGCTGGAGCT AGGCCGGCTA GGCCGCGGCC GCCCGGGTTT TTATCTCGAG 60**

**ACAAAAAGAC GGACCGGGCC CGGCCATATA GGCCAGTACC CAATTCGCCC TATAG 115**

*7. azonosítási számú szekvencia*

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 103 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris

40

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
szintetikus DNS-oligonuk-  
leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pA1

(xi) Szekvencia leírása:

**CGGCCGCCCC GGTTTTTATC TCGACATATG CTGCAGTTAA CGAATTCCAT GGGGATCCGA 60**

**TATCAAGCTT AGGCCTGTCG ACGTCGAGAC AAAAAGACGG ACC 103**

*8. azonosítási számú szekvencia*

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 103 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris

50

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
szintetikus DNS-oligonuk-  
leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pA2

(xi) Szekvencia leírása:

**CGGCCGCCCC GGTTTTTATC TCGACGTCGA CAGGCCTAAG CTTGATATCG GATCCCCATG 60**

**GAATTCGTTA ACTGCAGCAT ATGTCGAGAC AAAAAGACGG ACC 103**

## 9. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 213 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

pA1-S1

## (xi) Szekvencia leírása:

CCCGGGTTTT TATCTCGACA TACGGCTTGG TATAGCGGAC AACTAAGTAA TTGTAAAGAA 60  
 GAAACGAAA CTATCAAAAC CGTTTATGAA ATGATAGAAA AAAGAATATA AATAATCCTG 120  
 TATTTTAGTT TAAGTAACAG TAAATAATG AGTAGAAAAT ACTATTTTTT ATAGCCTATA 180  
 AATCATGAAT TCGGATCCGA TATCAAGCTT AGG 213

## 10. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 215 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

pA2-S1

## (xi) Szekvencia leírása:

CAGGCCTAAG CTTGATATCG GATCCGAATT CATGATTTAT AGGCTATAAA AAATAGTATT 60  
 TTCTACTCAT TATTTTACTG TTACTTAAAC TAAATACAG GATTATTTAT ATTCTTTTTT 120  
 CTATCATTTT ATAAACGGTT TTGATAGTTT CGTTTTCTTC TTTACAATTA CTTAGTTGTC 180  
 CGCTATACCA AGCCGTATGT CGAGACAAAA AGACG 215

## 11. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 88 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

pA1-S2

## (xi) Szekvencia leírása:

TCTCGACATA TGCTGCAGTT GGAAGCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTGGC ATATAAATAG 60  
 GCTGCAGGAA TTCCATGGGG ATCCGATA 88

## 12. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 92 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

pA2-S2

## (xi) Szekvencia leírása:

TTGATATCGG ATCCCCATGG AATTCCTGCA GCCTATTTAT ATGCCAAAAA AAAAAAAAAA 60  
 AAAAAGCTTC CCAACTGCAG CATATGTGCA GA 92

## 13. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 127 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

p2gpt-S3A (4.7 ábra)

## (xi) Szekvencia leírása:

TACCCTTAAG TTGGGCTGCA GAAGCTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGGCAT ATAAATGAAT 60  
 TCCATGGCCC GGAAGGCCT CGGACCGGC CCGCCATAT AGGCCAGCGA TACCGTCGCG 120  
 GCCGCGA 127

14. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

(A) hosszúság: 134 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés: egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonuk-  
 leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón: pN2gpt-S4

(xi) Szekvencia leírása:

TACCCTTAAG TTGGGCTGCA GAAGCTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGGCAT ATAAATCGTT 60  
 AACGAATTCC ATGGCCCGGG AAGGCCTCGG ACCGGGCCCCG GCCATATAGG CCAGCGATAC 120  
 CGTCGCGGCC GCGA 134

15. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

(A) hosszúság: 1988 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés: egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonuk-  
 leotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón: pA1S1-olvadáspon

(xi) Szekvencia leírása:

TTTTATAGCC TATAAATCAT GAATTCGCG CACGTCCGAG GCTTGCAGCT GCCTGGCTGC 60  
 CTGGCCCTGG CTGCCCTGTG TAGCCTTGTG CACAGCCAGC ATGTGTTCTT GGCTCCTCAG 120  
 CAAGCACGGT CGCTGCTCCA GCGGGTCCGG CGAGCCAACA CCTTCTTGA GGAGGTGCGC 180  
 AAGGGCAACC TAGAGCGAGA GTGCGTGGAG GAGACGTGCA GCTACGAGGA GGCCTTCGAG 240  
 GCTCTGGAGT CCTCCACGGC TACGGATGTG TTCTGGGCCA AGTACACAGC TTGTGAGACA 300  
 GCGAGGACGC CTCGAGATAA GCTTGCTGCA TGTCTGGAAG GTAACGTGTC TGAGGGTCTG 360  
 GGTACGAACCT ACCGAGGGCA TGTGAACATC ACCCGGTCAG GCATTGAGTG CCAGCTATGG 420  
 AGGAGTCGCT ACCCACATAA GCCTGAAATC AACTCCACTA CCCATCCTGG GGCCGACCTA 480  
 CAGGAGAATT TCTGCCGCAA CCCCAGACAGC AGCAACACGG GACCATGGTG CTACACTACA 540  
 GACCCACCG TGAGGAGGCA GGAATGCAGC ATCCCTGTCT GTGGCCAGGA TCAAGTCACT 600  
 GTAGCGATGA CTCCACGCTC CGAAGGCTCC AGTGTGAATC TGTCACCTCC ATTGGAGCAG 660  
 TGTGTCCCTG ATCGGGGGCA GCAGTACCAG GGGCGCCTGG CGGTGACCAC ACATGGGCTC 720  
 CCCTGCCTGG CCTGGGCCAG CGCACAGGCC AAGGCCCTGA GCAAGCACCA GGACTTCAAC 780  
 TCAGCTGTGC AGCTGGTGGA GAACTTCTGC CGCAACCCAG ACGGGGATGA GGAGGGCGTG 840  
 TGGTGCTATG TGGCCGGGAA GCCTGGCGAC TTTGGGTACT GCGACCTCAA CTATTGTGAG 900  
 GAGGCCGTGG AGGAGGAGAC AGGAGATGGG CTGGATGAGG ACTCAGACAG GGCCATCGAA 960  
 GGGCGTACCG CCACAAGTGA GTACCAGACT TTCTTCAATC CGAGGACCTT TGGCTCGGGA 1020  
 GAGGCAGACT GTGGGCTGCG ACCTCTGTTC GAGAAGAAGT CGCTGGAGGA CAAAACCGAA 1080  
 AGAGAGCTCC TGGAATCCTA CATCGACGGG CGCATTGTGG AGGGCTCGGA TGCAGAGATC 1140  
 GGCATGTCAC CTTGGCAGGT GATGCTTTTC CGGAAGAGTC CCCAGGAGCT GCTGTGTGGG 1200

GCCAGCCTCA TCAGTGACCG CTGGGTCCTC ACCGCCGCC ACTGCCTCCT GTACCCGCCC 1260  
 TGGGACAAGA ACTTCACCGA GAATGACCTT CTGGTGCGCA TTGGCAAGCA CTCCCGCACC 1320  
 AGGTACGAGC GAAACATTGA AAAGATATCC ATGTTGGAAA AGATCTACAT CCACCCAGG 1380  
 TACAACTGGC GGGAGAACCT GGACCGGGAC ATTGCCCTGA TGAAGCTGAA GAAGCCTGTT 1440  
 GCCTTCAGTG ACTACATTCA CCCTGTGTGT CTGCCCAGCA GGGAGACGGC AGCCAGCTTG 1500  
 CTCCAGGCTG GATACAAGGG GCGGGTGACA GGCTGGGGCA ACCTGAAGGA GACGTGGACA 1560  
 GCCAACGTTG GTAAGGGGCA GCCCAGTGTC CTGCAGGTGG TGAACCTGCC CATTGTGGAG 1620  
 CGGCCGGTCT GCAAGGACTC CACCCGGATC CGCATCACTG ACAACATGTT CTGTGCTGGT 1680  
 TACAAGCCTG ATGAAGGGAA ACGAGGGGAT GCCTGTGAAG GTGACAGTGG GGGACCCTTT 1740  
 GTCATGAAGA GCCCCTTTAA CAACCGCTGG TATCAAATGG GCATCGTCTC ATGGGGTGAA 1800  
 GGCTGTGACC GGGATGGGAA ATATGGCTTC TACACACATG TGTTCGCCT GAAGAAGTGG 1860  
 ATACAGAAGG TCATTGATCA GTTTGGAGAG TAGGGGGCCA CTCATATTCT GGGCTCCTGG 1920  
 AACCAATCCC GTGAAAGAAT TATTTTTGTG TTTCTAAAC TAGAATTCGG ATTCGATATC 1980  
 AAGCTTAG 1988

16. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 26 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav

szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

odN1

(xi) Szekvencia leírása:

GGCCAGGCCT TTAAATTAA GATATC

26

17. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 111 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav

szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pN2gpt-GPg

(xi) Szekvencia leírása:

TTTTTGGCAT ATAAATCGTT CCAGTCCCAA AATGTAATTG GACGGGAGAC AGAGTGACGC

60

ACGCGGCCGC TCTAGAACTA GTGGATCCCC CAACGAATTC CATGGCCCCG G

111

18. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 2296 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav

szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pN2gpt-LPg

(xi) Szekvencia leírása:

ATAAATCGTT AACGAATTCC ATGGAACATA AGGAAGTGGT TCTTCTACTT CTTTTATTTC

60

TGAAATCAGG TCAAGGAAAA GTGTATCTCT CAGAGTGCAA GACTGGGAAT GGAAAGAACT

120

ACAGAGGGAC GATGTCCAAA ACAAAAAATG GCATCACCTG TCAAAAATGG AGTTCCACTT

180

CTCCCCACAG ACCTAGATTTC TCACCTGCTA CACACCCCTC AGAGGGACTG GAGGAGAACT

240

ACTGCAGGAA TCCAGACAAC GATCCGCAGG GGCCCTGGTG CTATACTACT GATCCAGAAA

300

AGAGATATGA CTA CTGCGAC ATTCTTGAGT GTGAAGAGGA ATGTATGCAT TGCAGTGGAG

360

|             |            |            |             |            |            |      |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| AAAACCTATGA | CGGCAAAATT | TCCAAGACCA | TGTCTGGACT  | GGAATGCCAG | GCCTGGGACT | 420  |
| CTCAGAGCCC  | ACACGTCAT  | GGATACATTC | CTTCCAAATT  | TCCAAACAAG | AACCTGAAGA | 480  |
| AGAATTACTG  | TCGTAACCCC | GATAGGGAGC | TGCGGCCTTG  | GTGTTTCACC | ACCGACCCCA | 540  |
| ACAAGCGCTG  | GGAACCTTGC | GACATCCCCC | GCTGCACAAC  | ACCTCCACCA | TCTTCTGGTC | 600  |
| CCACCTACCA  | GTGTCTGAAG | GGAACAGGTG | AAAACCTATCG | CGGGAATGTG | GCTGTTACCG | 660  |
| TTTCCGGGCA  | CACCTGTCAG | CACTGGAGTG | CACAGACCCC  | TCACACACAT | AACAGGACAC | 720  |
| CAGAAAACCTT | CCCCTGCAAA | AATTTGGATG | AAAACCTACTG | CCGCAATCCT | GACGGAAAAA | 780  |
| GGGCCCCATG  | GTGCCATACA | ACCAACAGCC | AAGTGCGGTG  | GGAGTACTGT | AAGATACCGT | 840  |
| CCTGTGACTC  | CTCCCCAGTA | TCCACGGAAC | AATTGGCTCC  | CACAGCACCA | CCTGAGCTAA | 900  |
| CCCCTGTGGT  | CCAGGACTGC | TACCACGGTG | ATGGACAGAG  | CTACCGAGGC | ACATCCTCCA | 960  |
| CCACCACCAC  | AGGAAAGAAG | TGTCAGTCTT | GGTCATCTAT  | GACACCACAC | CGGCACCAGA | 1020 |
| AGACCCGAGA  | AAACTACCCA | AATGCTGGCC | TGACAATGAA  | CTACTGCAGG | AATCCAGATG | 1080 |
| CCGATAAAGG  | CCCCTGGTGT | TTTACCACAG | ACCCCAGCGT  | CAGGTGGGAG | TACTGCAACC | 1140 |
| TGAAAAAATG  | CTCAGGAACA | GAAGCGAGTG | TGTAGCACC   | TCCGCCTGTT | GTCCTGCTTC | 1200 |
| CAGATGTAGA  | GACTCCTTCC | GAAGAAGACT | GTATGTTTGG  | GAATGGGAAA | GGATACCGAG | 1260 |
| GCAAGAGGGC  | GACCACTGTT | ACTGGGACGC | CATGCCAGGA  | CTGGGCTGCC | CAGGAGCCCC | 1320 |
| ATAGACACAG  | CATTTTCACT | CCAGAGACAA | ATCCACGGGC  | GGGTCTGGAA | AAAAATTACT | 1380 |
| GCCGTAACCC  | TGATGGTGAT | GTAGGTGGTC | CCTGGTGCTA  | CACGACAAAT | CCAAGAAAAC | 1440 |
| TTTACGACTA  | CTGTGATGTC | CCTCAGTGTC | CGGCCCCCTC  | ATTTGATTGT | GGGAAGCCTC | 1500 |
| AAGTGGAGCC  | GAAGAAATGT | CCTGGAAGGG | TTGTGGGGGG  | GTGTGTGGCC | CACCCACATT | 1560 |
| CCTGGCCCTG  | GCAAGTCAGT | CTTAGAACAA | GGTTTGGAAT  | GCACCTCTGT | GGAGGCACCT | 1620 |
| TGATATCCCC  | AGAGTGGGTG | TTGACTGCTG | CCCACTGCTT  | GGAGAAGTCC | CCAAGGCCTT | 1680 |
| CATCCTACAA  | GGTCATCCTG | GGTGACACCC | AAGAAGTGAA  | TCTCGAACCG | CATGTTCAGG | 1740 |
| AAATAGAAGT  | GTCTAGGCTG | TTCTTGGAGC | CCACACGAAA  | AGATATTGCC | TTGCTAAAGC | 1800 |
| TAAGCAGTCC  | TGCCGTCATC | ACTGACAAAG | TAATCCCAGC  | TTGTCTGCCA | TCCCCAAATT | 1860 |
| ATGTGGTCGC  | TGACCGGACC | GAATGTTTCA | TCACTGGCTG  | GGGAGAAACC | CAAGGTACTT | 1920 |
| TTGGAGCTGG  | CCTTCTCAAG | GAAGCCCAGC | TCCCTGTGAT  | TGAGAATAAA | GTGTGCAATC | 1980 |
| GCTATGAGTT  | TCTGAATGGA | AGAGTCCAAT | CCACCGAACT  | CTGTGCTGGG | CATTTGGCCG | 2040 |
| GAGGCACTGA  | CAGTTGCCAG | GGTGACAGTG | GAGGTCCTCT  | GGTTTGCTTC | GAGAAGGACA | 2100 |
| AATACATTTT  | ACAAGGAGTC | ACTTCTTGGG | GTCTTGGCTG  | TGCACGCCCC | AATAAGCCTG | 2160 |
| GTGTCTATGT  | TCGTGTTTCA | AGGTTTGTTA | CTTGGATTGA  | GGGAGTGATG | AGAAATAATT | 2220 |
| AATTGGACGG  | GAGACAGAGT | GACGCACGCG | GCCGCTCTAG  | AACTAGTGGA | TCCCCCGGGA | 2280 |
| AGGCCTCGGA  | CCGGGC     |            |             |            |            | 2296 |

19. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 56 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: pN2gpt-gpt160
- (xi) Szekvencia leírása:

**TTTTTGGCAT ATAAATCGTT ATCCACCATG TAAGATAACG AATTCCATGG CCCGGG 56**

20. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 331 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: pvWF
- (xi) Szekvencia leírása:

**TTTTTTTTTGG CATATAAATC GCGGCCGCGG GTGGTTGGTG GATGTCACAG CTTGGGCTTT 60**

**ATCTCCCCCA GCAGTGGGAT TCCACAGCCC CTGGGCTACA TAACAGCAAG ACAGTCCGGA 120**

**GCTGTAGCAG ACCTGATTGA GCCTTTGCAG CAGCTGAGAG CATGGCCTAG GGTGGGCGGC 180**

**ACCATTGTCC AGCAGCTGAG TTTCCCAGGG ACCTTGGAGA TAGCCGCAGC CCTCATTTGC 240**

**AGGGGAAGAT GTGAGGCTGC TGCAGCTGCA TGGGTGCCTG CTGCTGCCTG CTTGGCCTG 300**

**ATGGCGGCCG CCCGGGTTTT TATCTCGAGA C 331**

21. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 50 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: pEcoK-dhr
- (xi) Szekvencia leírása:

**ATTAGCTCT CGTTTCAGAC GCGGCCGCGG TAATTAGATT CTCCCACATT 50**

22. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 1209 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: pdhr-gpt
- (xi) Szekvencia leírása:

**ATTAGCTCT CGTTTCAGAC GCGGCCGCTC TAGAACTAGT GGATCCCCCA ACTTAAGGGT 60**

**ACCGCCTCGA CATCTATATA CTATATAGTA ATACCAATAC TCAAGACTAC GAAACTGATA 120**

**CAATCTCTTA TCATGTGGGT AATGTTCTCG ATGTCGAATA GCCATATGCC GGTAGTTGCG 180**

**ATATACATAA ACTGATCACT AATTCCAAAC CCACCCGCTT TTTATAGTAA GTTTTTTACC 240**

**CATAAATAAT AAATACAATA ATTAATTTCT CGTAAAAGTA GAAAATATAT TCTAATTTAT 300**

**TGCACGGTAA GGAAGTAGAA TCATAAAGAA CAGTGACGGA TGATCCCCAA GCTTGGACAC 360**

**AAGACAGGCT TGCAGATAT GTTTGAGAAT ACCACTTTAT CCCGCGTCAG GGAGAGGCAG 420**

**TGCGTAAAAA GACGCGGACT CATGTGAAAT ACTGGTTTTT AGTGCGCCAG ATCTCTATAA 480**

**TCTCGCGCAA CCTATTTTCC CCTCGAACAC TTTTAAAGCC GTAGATAAAC AGGCTGGGAC 540**

**ACTTCACATG AGCGAAAAAT ACATCGTCAC CTGGGACATG TTGCAGATCC ATGCACGTAA 600**

**ACTCGCAAGC CGACTGATGC CTTCTGAACA ATGGAAAGGC ATTATTGCCG TAAGCCGTGG 660**

CGGTCTGGTA CCGGGTGCCT TACTGGCGCG TGAAGTGGGT ATTCGTCATG TCGATACCGT 720  
 TTGTATTTCC AGCTACGATC ACGACAACCA GCGCGAGCTT AAAGTGCTGA AACGCGCAGA 780  
 AGGCGATGGC GAAGGCTTCA TCGTTATTGA TGACCTGGTG GATACCGGTG GTACTGCGGT 840  
 TGCGATTTCGT GAAATGTATC CAAAAGCGCA CTTTGTCCACC ATCTTCGCAA AACCGGCTGG 900  
 TCGTCCGCTG GTTGATGACT ATGTTGTTGA TATCCCGCAA GATACCTGGA TTGAACAGCC 960  
 GTGGGATATG GGCCTCGTAT TCGTCCCGCC AATCTCCGGT CGCTAATCTT TTCAACGCCT 1020  
 GGCCTGCGG GGCCTTGTTT TTTTAACTT CAGGCGGGT ACAATAGTTT CCAGTAAGTA 1080  
 TTCTGGAGGC TGCATCCATG ACACAGGCAA ACCTGAGCGA AACCTGTTC AAACCCGCT 1140  
 TTGGGCTGCA GGAATTCGAT ATCAAGCTTA TCGATACCGT CGCGGCCGCG GTAATTAGAT 1200  
 TCTCCACA 1209

23. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 26 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

odN2

(xi) Szekvencia leírása:

GGCCGATATC TTAATTTAAA AGGCCT

26

24. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 24 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

odN3

(xi) Szekvencia leírása:

CCAATGTTAC GTGGGTTACA TCAG

24

25. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 18 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

I–SceI linker 1

(xi) Szekvencia leírása:

TAGGGATAAC AGGGTAAT

18

26. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 18 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

I–SceI linker 2

(xi) Szekvencia leírása:

ATTACCCTGT TATCCCTA

18

27. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 23 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

odS2

(xi) Szekvencia leírása:

GTATAAAGTC CGACTATTGT TCT

23

|                                                                           |             |                          |                                |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|
| 28. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 26 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | odS3                           |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |
| <b>TCTGAGGCCT AATAGACCTC TGTACA</b>                                       |             |                          | <b>26</b>                      |
| 29. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 13 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | Sfil(1)                        |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |
| <b>GGCCGGCTAG GCC</b>                                                     |             |                          | <b>13</b>                      |
| 30. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 13 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | Sfil(2)                        |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |
| <b>GGCCATATAG GCC</b>                                                     |             |                          | <b>13</b>                      |
| 31. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 66 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | odTK1                          |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |
| <b>GAGTCGATGT AACACTTTCT ACAGGATCCG TTAAC TCGCG AGAATTCCAT CACGTTAGAA</b> |             |                          | <b>60</b>                      |
| <b>AATGCG</b>                                                             |             |                          | <b>66</b>                      |
| 32. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 79 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | P-J(1)                         |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |
| <b>GATCCGGCCG GCTAGGCCGC GGCCGCCCG GTTTTATCT CGAGACAAAA AGACGGACCG</b>    |             |                          | <b>60</b>                      |
| <b>GGCCCGGCCA TATAGGCC</b>                                                |             |                          | <b>79</b>                      |
| 33. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 79 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | P-J(2)                         |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |
| <b>AATTGGGCCT ATATGGCCGG GCCCGGTCCG TCTTTTGTGTC TCGAGATAAA AACCCGGGCG</b> |             |                          | <b>60</b>                      |
| <b>GCCGCGGCCT AGCCGGCCG</b>                                               |             |                          | <b>79</b>                      |
| 34. azonosítási számú szekvencia                                          |             | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                 |             | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                            | 18 bázispár | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (B) típus:                                                                | nukleinsav  | (B) klón:                | odTK2                          |
| (C) szál típusa:                                                          | egyes       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (D) topológia:                                                            | lineáris    |                          |                                |

AGAAGCCGTG GGTCATTG

18

35. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 21 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

5

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (vii) Közvetlen forrás:  
 (B) klón: odTK3  
 (xi) Szekvencia leírása:

TACCGTGTCTG CTGTAACCTTA C

21

36. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 75 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

15

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (vii) Közvetlen forrás:  
 (B) klón: P-A(0.1)  
 (xi) Szekvencia leírása:

AGGCCGGCTA GGCCGCGGCC GCCCGGGTTT TTATCTCGAG ACAAAAAGAC GGACCGGGCC

60

CGGCCATATA GGCCA

75

37. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 83 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

25

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (vii) Közvetlen forrás:  
 (B) klón: P-A(0.2)  
 (xi) Szekvencia leírása:

GTACTGGCCT ATATGGCCGG GCCCGGTCCG TCTTTTTGTC TCGAGATAAA AACCCGGGCG

60

GCCGCGCCT AGCCGCGCCTA GCT

83

38. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 55 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

35

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (vii) Közvetlen forrás:  
 (B) klón: P-artP(11)  
 (xi) Szekvencia leírása:

GGCCACGTTT TTATGGGAAG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGGCATATAA ATCGC

55

39. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 55 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

40

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (vii) Közvetlen forrás:  
 (B) klón: P-artP(12)  
 (xi) Szekvencia leírása:

GGCCGCGATT TATATGCCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGC TTCCCATAAA AACGT

55

40. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 93 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

50

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (vii) Közvetlen forrás:  
 (B) klón: P-artP(8)  
 (xi) Szekvencia leírása:

CGCTGGCCTA TATGGCCGGG CCCGGTCCGA GGCCTTCCCG GGCCATGGAA TTCATTTATA

60

TGCCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGCTTCT GCA

93

41. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői:  
 (A) hosszúság: 97 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav

60

- (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris  
 (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav

|                                                                          |                                |                          |                                |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| (A) Megnevezés:                                                          | szintetikus DNS-oligonukleotid | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
|                                                                          |                                | (B) klón:                | P-artP(10)                     |
|                                                                          |                                | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| <b>CGCTGGCCTA TATGGCCGGG CGTCCGAGGC CTTCCCGGGC CATGGAATTC GTTAACGATT</b> |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>60</b>                      |
| <b>TATATGCCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAGC TTCTGCA</b>                        |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>97</b>                      |
| 42. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                           | 50 bázispár                    | 10                       |                                |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | (B) klón:                | oligonukleotid P-hr(3)         |
| (D) topológia:                                                           | lineáris                       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| <b>ATTAGCTCT CGTTTCAGAC GCGGCCGCGG TAATTAGATT CTCCCACATT</b>             |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>50</b>                      |
| 43. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (D) topológia:           | lineáris                       |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (A) hosszúság:                                                           | 10 bázispár                    | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | 20                       |                                |
| <b>CTAGCCCCGGG</b>                                                       |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>10</b>                      |
| 44. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                           | 47 bázispár                    | 25                       |                                |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | (B) klón:                | P-P2 5' (1)                    |
| (D) topológia:                                                           | lineáris                       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| <b>GTACGTACGG CTGCAGTTGT TAGAGCTTGG TATAGCGGAC AACTAAG</b>               |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>47</b>                      |
| 45. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                           | 50 bázispár                    | 35                       |                                |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | (B) klón:                | P-P2 3' (1)                    |
| (D) topológia:                                                           | lineáris                       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| <b>TCTGACTGAC GTTAACGATT TATAGGCTAT AAAAAATAGT ATTTTCTACT</b>            |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>50</b>                      |
| 46. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                           | 20 bázispár                    | 40                       |                                |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | (B) klón:                | P-SM(2)                        |
| (D) topológia:                                                           | lineáris                       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| <b>GTCTTGAGTA TTGGTATTAC</b>                                             |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>20</b>                      |
| 47. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                           | 23 bázispár                    | 50                       |                                |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | (B) klón:                | P-SM(3)                        |
| (D) topológia:                                                           | lineáris                       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| <b>CGAAACTATC AAAACGCTTT ATG</b>                                         |                                |                          |                                |
|                                                                          |                                |                          | <b>23</b>                      |
| 48. azonosítási számú szekvencia                                         |                                | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (i) Szekvencia jellemzői:                                                |                                | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (A) hosszúság:                                                           | 53 bázispár                    | 55                       |                                |
| (B) típus:                                                               | nukleinsav                     | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa:                                                         | egyes                          | (B) klón:                | P-MN(1)                        |
| (D) topológia:                                                           | lineáris                       | 60                       |                                |
|                                                                          |                                |                          |                                |

**AGCTAGCTGA ATTCAGGCCT CATGAGAGTG AAGGGGATCA GGAGGAATTA TCA 53**

49. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 30 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: P-MN(2)
- (xi) Szekvencia leírása:

**CATCTGATGC ACAAAATAGA GTGGTGGTTG 30**

50. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 27 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: P-Seq(2)
- (xi) Szekvencia leírása:

**CTGTGGGTAC ACAGGCTTGT GTGGCCC 27**

51. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 25 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: P-Seq(3)
- (xi) Szekvencia leírása:

**CAATTTTCT GTAGCACTAC AGATC 25**

52. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 45 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: o-542
- (xi) Szekvencia leírása:

**CGATTACGTA GTTAACGCGG CCGCGGCCTA GCCGGCCATA AAAAT 45**

53. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 47 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: o-544
- (xi) Szekvencia leírása:

**CTAGATTTTT ATGGCCGGCT AGGCCGCGGC CGCGTTAACT ACGTAAT 47**

54. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 50 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid.
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: o-541
- (xi) Szekvencia leírása:

**CTTTTTCTGC GGCCGCGGAT ATGGCCCGGT CCGGTAACT ACGTAGACGT 50**

55. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 53 bázispár
- (B) típus: nukleinsav
- (C) szál típusa: egyes
- (D) topológia: lineáris
- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav
- (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid
- (vii) Közvetlen forrás:
- (B) klón: o-543
- (xi) Szekvencia leírása:

**CTACGTAGTT AACCGACCG GGCCATATAG GCCGCGGCCG CAGAAAAAGC ATG 53**

56. azonosítási számú szekvencia
- (i) Szekvencia jellemzői:
- (A) hosszúság: 51 bázispár
- (B) típus: nukleinsav

- (C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid

- (vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: o-selPI  
(xi) Szekvencia leírása:

5

**CGATAAAAAT TGAAATTTTA TTTTTTTTTT TTGGAATATA AATAAGGCCT C** **51**

57. azonosítási számú szekvencia  
(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 53 bázispár **10**  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: o-selPII  
(xi) Szekvencia leírása:

**CATGGAGGCC TTATTTATAT TCCAAAAAAA AAAAATAAAA TTTCAATTTT TAT** **53**

58. azonosítási számú szekvencia  
(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 14 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes **20**  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: o-830  
(xi) Szekvencia leírása:

**TCGACTTTTT ATCA** **14**

59. azonosítási számú szekvencia  
(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 12 bázispár **25**  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: o-857  
(xi) Szekvencia leírása:

**TATGATAAAA AC** **12**

60. azonosítási számú szekvencia  
(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 40 bázispár  
(B) típus: nukleinsav **35**  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: o-NcoI  
(xi) Szekvencia leírása:

**GAGCAGAAGA CAGTGGCCAT GGCCGTGAAG GGGATCAGGA** **40**

61. azonosítási számú szekvencia  
(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 30 bázispár **40**  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: o-NsiI  
(xi) Szekvencia leírása: **45**

**CATAAACTGA TTATATCCTC ATGCATCTGT** **30**

62. azonosítási számú szekvencia  
(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 4145 bázispár **50**  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: egyes  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: pS2gpt-S4  
(xi) Szekvencia leírása:

**GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTTC TAAATACATT** **60**

**CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA** **120**

**GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT** **180**

**GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT** **240**

|            |            |            |             |            |             |      |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| TGGGTGCACG | AGTGGGTTAC | ATCGAACTGG | ATCTCAACAG  | CGGTAAGATC | CTTGAGAGTT  | 300  |
| TTCGCCCCGA | AGAACGTTTT | CCAATGATGA | GCACTTTTAA  | AGTTCTGCTA | TGTGGCGCGG  | 360  |
| TATTATCCCG | TATTGACGCC | GGGCAAGAGC | AACTCGSTCG  | CCGCATACAC | TATTCTCAGA  | 420  |
| ATGACTTGGT | TGAGTACTCA | CCAGTCACAG | AAAAGCATCT  | TACGGATGGC | ATGACAGTAA  | 480  |
| GAGAATTATG | CAGTGCTGCC | ATAACCATGA | GTGATAACAC  | TGCGGCCAAC | TTACTTCTGA  | 540  |
| CAACGATCGG | AGGACCGAAG | GAGCTAACCG | CTTTTTTGCA  | CAACATGGGG | GATCATGTAA  | 600  |
| CTCGCCTTGA | TCGTTGGGAA | CCGGAGCTGA | ATGAAGCCAT  | ACCAAACGAC | GAGCGTGACA  | 660  |
| CCACGATGCC | TGTAGCAATG | GCAACAACGT | TGCGCAAAC   | ATTAAGTGGC | GAAGTACTTA  | 720  |
| CTCTAGCTTC | CCGGCAACAA | TTAATAGACT | GGATGGAGGC  | GGATAAAGTT | GCAGGACCAC  | 780  |
| TTCTGCGCTC | GGCCCTTCCG | GCTGGCTGGT | TTATTGCTGA  | TAAATCTGGA | GCCGGTGAGC  | 840  |
| GTGGGTCTCG | CGGTATCATT | GCAGCACTGG | GGCCAGATGG  | TAAGCCCTCC | CGTATCGTAG  | 900  |
| TTATCTACAC | GACGGGGAGT | CAGGCAACTA | TGGATGAACG  | AAATAGACAG | ATCGCTGAGA  | 960  |
| TAGGTGCCTC | ACTGATTAAG | CATTGGTAAC | TGTCAGACCA  | AGTTTACTCA | TATATACTTT  | 1020 |
| AGATTGATTT | AAAACITCAT | TTTTAATTTA | AAAGGATCTA  | GGTGAAGATC | CTTTTTGATA  | 1080 |
| ATCTCATGAC | CAAAATCCCT | TAACGTGAGT | TTTCGTTCCA  | CTGAGCGTCA | GACCCCGTAG  | 1140 |
| AAAAGATCAA | AGGATCTTCT | TGAGATCCTT | TTTTTCTGCG  | CGTAATCTGC | TGCTTGCAAA  | 1200 |
| CAAAAAAACC | ACCGCTACCA | GCGGTGGTTT | GTTTGCCGGA  | TCAAGAGCTA | CCAAGTCTTT  | 1260 |
| TTCCGAAGGT | AACTGGCTTC | AGCAGAGCGC | AGATACCAAA  | TACTGTCCTT | CTAGTGTAGC  | 1320 |
| CGTAGTTAGG | CCACCACTTC | AAGAACTCTG | TAGCACC GCC | TACATACCTC | GCTCTGCTAA  | 1380 |
| TCCTGTTACC | AGTGGCTGCT | GCCAGTGGCG | ATAAGTCGTG  | TCTTACCGGG | TTGGACTCAA  | 1440 |
| GACGATAGTT | ACCGGATAAG | GCGCAGCGGT | CGGGCTGAAC  | GGGGGGTTTC | TGCACACAGC  | 1500 |
| CCAGCTTGGA | GCGAACGACC | TACACCGAAC | TGAGATACCT  | ACAGCGTGAG | CTATGAGAAA  | 1560 |
| GCGCCACGCT | TCCCGAAGGG | AGAAAGGCGG | ACAGGTATCC  | GGTAAGCGGC | AGGGTCGGAA  | 1620 |
| CAGGAGAGCG | CACGAGGGAG | CTTCCAGGGG | GAAACGCCTG  | GTATCTTTAT | AGTCCTGTCT  | 1680 |
| GGTTTCGCCA | CCTCTGACTT | GAGCGTCGAT | TTTGTGTATG  | CTCGTCAGGG | GGGCGGAGCC  | 1740 |
| TATGGAAAAA | CGCCAGCAAC | GCGGCCTTTT | TACGGTTCCT  | GGCCTTTTGC | TGGCCTTTTG  | 1800 |
| CTCACATGTT | CTTTCCTGCG | TTATCCCTTG | ATTCTGTGGA  | TAACCGTATT | ACCGCCTTTG  | 1860 |
| AGTGAGCTGA | TACCGCTCGC | CGCAGCCGAA | CGACCGAGCG  | CAGCGAGTCA | GTGAGCGAGG  | 1920 |
| AAGCGGAAGA | GCGCCCAATA | CGCAAACCGC | CTCTCCCCGC  | GCGTTGGCCG | ATTCAATTAAT | 1980 |
| GCAGCTGGCA | CGACAGGTTT | CCCGACTGGA | AAGCGGGCAG  | TGAGCGCAAC | GCAATTAATG  | 2040 |
| TGAGTTAGCT | CACTCATTAG | GCACCCAGG  | CTTTACACTT  | TATGCTTCCG | GCTCGTATGT  | 2100 |
| TGTGTGGAAT | TGTGAGCGGA | TAACAATTTT | ACACAGGAAA  | CAGCTATGAC | CATGATTACG  | 2160 |
| CCAAGCGCGC | AATTAACCTT | CACTAAAGGG | AACAAAAGCT  | GGAGCTCCAC | CGCGGTGGCG  | 2220 |
| GCCGCTCTAG | CCCGGGCTAG | AACTAGTGGA | TCCCCCAAAG  | CGGGGTTTGA | ACAGGGTTTC  | 2280 |

|             |             |            |            |            |            |      |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| GCTCAGGTTT  | GCCTGTGTCA  | TGGATGCAGC | CTCCAGAATA | CTTACTGGAA | ACTATTGTAA | 2340 |
| CCCGCCTGAA  | GTTAAAAAGA  | ACAACGCCCC | GCAGTGCCAG | GCGTTGAAAA | GATTAGCGAC | 2400 |
| CGGAGATTGG  | CGGGACGAAT  | ACGACGCCCA | TATCCCACGG | CTGTTCAATC | CAGGTATCTT | 2460 |
| GCGGGATATC  | AACAACATAG  | TCATCAACCA | GCGGACGACC | AGCCGGTTTT | GCGAAGATGG | 2520 |
| TGACAAAGTG  | CGCTTTTGGG  | TACATTTTAC | GAATCGCAAC | CGCAGTACCA | CCGGTATCCA | 2580 |
| CCAGGTCATC  | AATAACGATG  | AAGCCTTCGC | CATCGCCTTC | TGCGCGTTTC | AGCACTTTAA | 2640 |
| GCTCGCGCTG  | GTTGTGCTGA  | TCGTAGCTGG | AAATACAAAC | GGTATCGACA | TGACGAATAC | 2700 |
| CCAGTTCACG  | CGCCAGTAAC  | GCACCCGGTA | CCAGACCGCC | ACGGCTTACG | GCAATAATGC | 2760 |
| CTTTCCATTG  | TTCAGAAGGC  | ATCAGTCGGC | TTGCGAGTTT | ACGTGCATGG | ATCTGCAACA | 2820 |
| TGTCCCAGGT  | GACGATGTAT  | TTTTCGCTCA | TGTGAAGTGT | CCCAGCCTGT | TTATCTACGG | 2880 |
| CTTAAAAAGT  | GTTTCGAGGGG | AAAATAGGTT | GCGCGAGATT | ATAGAGATCT | GGCGCACTAA | 2940 |
| AAACCAAGTAT | TTCACATGAG  | TCCGCGTCTT | TTTACGCACT | GCCTCTCCCT | GACGCGGGAT | 3000 |
| AAAGTGGTAT  | TCTCAAACAT  | ATCTCGCAAG | CCTGTCTTGT | GTCCAAGCTT | GGGGATCATC | 3060 |
| CGTCACTGTT  | CTTTATGATT  | CTACTTCCTT | ACCGTGCAAT | AAATTAGAAT | ATATTTTCTA | 3120 |
| CTTTTACGAG  | AAATTAATTA  | TTGTATTTAT | TATTTATGGG | TGAAAACTT  | ACTATAAAAA | 3180 |
| GCGGGTGGGT  | TTGGAATTAG  | TGATCAGTTT | ATGTATATCG | CAACTACCGG | CATATGGCTA | 3240 |
| TTTCGACATCG | AGAACATTAC  | CCACATGATA | AGAGATTGTA | TCAGTTTCGT | AGTCTTGAGT | 3300 |
| ATTGGTATTA  | CTATATAGTA  | TATAGATGTC | GAGGCGGTAC | CCTTAAGTTG | GGCTGCAGAA | 3360 |
| GCTTTTTTTT  | TTTTTTTTTT  | TTGGCATATA | AATCGTTAAC | GAATTCCATG | GCCCCGGAAG | 3420 |
| GCCTCGGACC  | GGGCCCCGCC  | ATATAGGCCA | GCGATACCGT | CGCGGCCGCG | ACCTCGAGGG | 3480 |
| GGGGCCCCGT  | ACCCAATTCT  | CCCTATAGTG | AGTCGTATTA | CGCGCGCTCA | CTGGCCGTCG | 3540 |
| TTTTACAACG  | TCGTGACTGG  | GAAAACCCTG | GCGTTACCCA | ACTTAATCGC | CTTGCAGCAC | 3600 |
| ATCCCCCTTT  | CGCCAGCTGG  | CGTAATAGCG | AAGAGGCCCG | CACCGATCGC | CCTTCCCAAC | 3660 |
| AGTTGCGCAG  | CCTGAATGGC  | GAATGGAAAT | TGTAAGCGTT | AATATTTTGT | TAAAATTCGC | 3720 |
| GTTAAATTTT  | TGTTAAATCA  | GCTCATTTTT | TAACCAATAG | GCCGAAATCG | GCAAAATCCC | 3780 |
| TTATAAATCA  | AAAGAATAGA  | CCGAGATAGG | GTTGAGTGTT | GTTCCAGTTT | GGAACAAGAG | 3840 |
| TCCACTATTA  | AAGAACGTGG  | ACTCCAACGT | CAAAGGGCGA | AAAACCGTCT | ATCAGGGCGA | 3900 |
| TGGCCCACTA  | CGTGAACCAT  | CACCCTAATC | AAGTTTTTTT | GGGTCGAGGT | GCCGTAAAGC | 3960 |
| ACTAAATCGG  | AACCCTAAAG  | GGAGCCCCCG | ATTTAGAGCT | TGACGGGGAA | AGCCGGCGAA | 4020 |
| CGTGGCGAGA  | AAGGAAGGGA  | AGAAAGCGAA | AGGAGCGGGC | GCTAGGGCGC | TGGCAAGTGT | 4080 |
| AGCGGTCACG  | CTGCGCGTAA  | CCACCACACC | CGCCGCGCTT | AATGCGCCGC | TACAGGGCGC | 4140 |
| GTCAG       |             |            |            |            |            | 4145 |

63. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

(A) hosszúság: 4277 bázispár

(B) típus:

(C) szál típusa:

(D) topológia:

nukleinsav

egyes

lineáris

|                                                         |            |                          |                                        |
|---------------------------------------------------------|------------|--------------------------|----------------------------------------|
| (ii) Molekula típusa:                                   |            | (vii) Közvetlen forrás:  |                                        |
| (A) Megnevezés:                                         |            | (B) klón:                |                                        |
|                                                         |            | (xi) Szekvencia leírása: |                                        |
| egyéb nukleinsav<br>szintetikus DNS-oligonuk-<br>leotid |            | pS2gpt-P2                |                                        |
| GTGGCACTTT                                              | TCGGGGAAAT | GTGCGCGGAA               | CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT 60    |
| CAAATATGTA                                              | TCCGCTCATG | AGACAATAAC               | CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA 120   |
| GGAAGAGTAT                                              | GAGTATTCAA | CATTTCCGTG               | TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT 180   |
| GCCTTCCTGT                                              | TTTTGCTCAC | CCAGAAACGC               | TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT 240   |
| TGGGTGCACG                                              | AGTGGGTTAC | ATCGAACTGG               | ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT 300   |
| TTCGCCCCGA                                              | AGAACGTTTT | CCAATGATGA               | GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG 360   |
| TATTATCCCG                                              | TATTGACGCC | GGGCAAGAGC               | AACTCGGTCTG CCGCATACAC TATTCTCAGA 420  |
| ATGACTTGGT                                              | TGAGTACTCA | CCAGTCACAG               | AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA 480   |
| GAGAATTATG                                              | CAGTGCTGCC | ATAACCATGA               | GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTAATTCTGA 540   |
| CAACGATCGG                                              | AGGACCGAAG | GAGCTAACCG               | CTTTTGTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA 600   |
| CTCGCCTTGA                                              | TCGTTGGGAA | CCGGAGCTGA               | ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA 660   |
| CCACGATGCC                                              | TGTAGCAATG | GCAACAACGT               | TGCGCAAAC TTAATACTGGC GAACTACTTA 720   |
| CTCTAGCTTC                                              | CCGGCAACAA | TTAATAGACT               | GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC 780   |
| TTCTGCGCTC                                              | GGCCCTTCCG | GCTGGCTGGT               | TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC 840   |
| GTGGGTCTCG                                              | CGGTATCATT | GCAGCACTGG               | GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG 900   |
| TTATCTACAC                                              | GACGGGGAGT | CAGGCAACTA               | TGGATGAACG AATAGACAG ATCGCTGAGA 960    |
| TAGGTGCCTC                                              | ACTGATTAAG | CATTGGTAAC               | TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT 1020  |
| AGATTGATTT                                              | AAAACCTCAT | TTTTAATTTA               | AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA 1080  |
| ATCTCATGAC                                              | CAAAATCCCT | TAACGTGAGT               | TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG 1140  |
| AAAAGATCAA                                              | AGGATCTTCT | TGAGATCCTT               | TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA 1200  |
| CAAAAAAACC                                              | ACCGCTACCA | GCGGTGGTTT               | GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT 1260  |
| TTCCGAAGGT                                              | AACTGGCTTC | AGCAGAGCGC               | AGATACCAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC 1320   |
| CGTAGTTAGG                                              | CCACCACTTC | AAGAACTCTG               | TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA 1380  |
| TCCTGTTACC                                              | AGTGGCTGCT | GCCAGTGGCG               | ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA 1440  |
| GACGATAGTT                                              | ACCGGATAAG | GCGCAGCGGT               | CGGGCTGAAC GGGGGGTTTCG TGCACACAGC 1500 |
| CCAGCTTGGA                                              | GCGAACGACC | TACACCGAAC               | TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA 1560  |
| GCGCCACGCT                                              | TCCCGAAGGG | AGAAAGGCGG               | ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA 1620  |
| CAGGAGAGCG                                              | CACGAGGGAG | CTTCCAGGGG               | GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCTG 1680 |
| GGTTTCGCCA                                              | CCTCTGACTT | GAGCGTCGAT               | TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC 1740  |
| TATGAAAAA                                               | CGCCAGCAAC | GCGGCCTTTT               | TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG 1800  |
| CTCACATGTT                                              | CTTTCCTGCG | TTATCCCTCG               | ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG 1860  |
| AGTGAGCTGA                                              | TACCGCTCGC | CGCAGCCGAA               | CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG 1920  |

|            |             |            |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| AAGCGGAAGA | GCGCCCAATA  | CGCAAACCGC | CTCTCCCCGC | GCGTTGGCCG | ATTCATTAAT | 1980 |
| GCAGCTGGCA | CGACAGGTTT  | CCCGACTGGA | AAGCGGGCAG | TGAGCGCAAC | GCAATTAATG | 2040 |
| TGAGTTAGCT | CACTCAATTAG | GCACCCCAGG | CTTTACACTT | TATGCTTCCG | GCTCGTATGT | 2100 |
| TGTGTGGAAT | TGTGAGCGGA  | TAACAATTTT | ACACAGGAAA | CAGCTATGAC | CATGATTACG | 2160 |
| CCAAGCGCGC | AATTAACCCT  | CACTAAAGGG | AACAAAAGCT | GGAGCTCCAC | CGCGGTGGCG | 2220 |
| GCCGCTCTAG | CCCGGGCTAG  | AACTAGTGGA | TCCCCCAAAG | CGGGGTTTGA | ACAGGGTTTC | 2280 |
| GCTCAGGTTT | GCCTGTGTCA  | TGGATGCAGC | CTCCAGAATA | CTTACTGGAA | ACTATTGTAA | 2340 |
| CCCGCTGAA  | GTTAAAAAGA  | ACAACGCCCG | GCAGTGCCAG | GCGTTGAAAA | GATTAGCGAC | 2400 |
| CGGAGATTGG | CGGGACGAAT  | ACGACGCCCA | TATCCCACGG | CTGTTCAATC | CAGGTATCTT | 2460 |
| GCGGGATATC | AACAACATAG  | TCATCAACCA | GCGGACGACC | AGCCGGTTTT | GCGAAGATGG | 2520 |
| TGACAAAGTG | CGCTTTTGGA  | TACATTTTAC | GAATCGCAAC | CGCAGTACCA | CCGGTATCCA | 2580 |
| CCAGGTCATC | AATAACGATG  | AAGCCTTCGC | CATCGCCTTC | TGCGCGTTTC | AGCACTTTAA | 2640 |
| GCTCGCGCTG | GTTGTCGTGA  | TCGTAGCTGG | AAATACAAAC | GGTATCGACA | TGACGAATAC | 2700 |
| CCAGTTCACG | CGCCAGTAAC  | GCACCCGGTA | CCAGACCGCC | ACGGCTTACG | GCAATAATGC | 2760 |
| CTTTCCATTG | TTCAGAAGGC  | ATCAGTCGGC | TTGCGAGTTT | ACGTGCATGG | ATCTGCAACA | 2820 |
| TGTCCCAGGT | GACGATGTAT  | TTTTCGCTCA | TGTGAAGTGT | CCCAGCCTGT | TTATCTACGG | 2880 |
| CTTAAAAAGT | GTTGAGGGG   | AAAATAGGTT | GCGCGAGATT | ATAGAGATCT | GGCGCACTAA | 2940 |
| AAACCAGTAT | TTCACATGAG  | TCCGCGTCTT | TTTACGCACT | GCCTCTCCCT | GACGCGGGAT | 3000 |
| AAAGTGGTAT | TCTCAAACAT  | ATCTCGCAAG | CCTGTCTTGT | GTCCAAGCTT | GGGGATCATC | 3060 |
| CGTCACTGTT | CTTTATGATT  | CTACTTCCTT | ACCGTGCAAT | AAATTAGAAT | ATATTTTCTA | 3120 |
| CTTTTACGAG | AAATTAATTA  | TTGTATTTAT | TATTTATGGG | TGAAAACTT  | ACTATAAAAA | 3180 |
| GCGGGTGGGT | TTGGAATTAG  | TGATCAGTTT | ATGTATATCG | CAACTACCGG | CATATGGCTA | 3240 |
| TTGACATCG  | AGAACATTAC  | CCACATGATA | AGAGATTGTA | TCAGTTTCGT | AGTCTTGAGT | 3300 |
| ATTGGTATTA | CTATATAGTA  | TATAGATGTC | GAGGCGGTAC | CCTTAAGTTG | GGCTGCAGTT | 3360 |
| GTTAGAGCTT | GGTATAGCGG  | ACAACAAAGT | AATTGTAAAG | AAGAAAACGA | AACTATCAAA | 3420 |
| ACCGTTTATG | AAATGATAGA  | AAAAAGAATA | TAAATAATCC | TGTATTTTAG | TTTAAGTAAC | 3480 |
| AGTAAAATAA | TGAGTAGAAA  | ATACTATTTT | TTATAGCCTA | TAAATCGTTA | ACGAATTCCA | 3540 |
| TGGCCCGGGA | AGGCCTCGGA  | CCGGGCCCGG | CCATATAGGC | CAGCGATACC | GTCGCGGCCG | 3600 |
| CGACCTCGAG | GGGGGGCCCC  | GTACCCAATT | CGCCCTATAG | TGAGTCGTAT | TACGCGCGCT | 3660 |
| CACTGGCCGT | CGTTTTACAA  | CGTCGTGACT | GGGAAAACCC | TGGCGTTACC | CAACTTAATC | 3720 |
| GCCTTGCAGC | ACATCCCCCT  | TTGCCAGCT  | GGCGTAATAG | CGAAGAGGCC | CGCACCGATC | 3780 |
| GCCCTTCCCA | ACAGTTGCGC  | AGCCTGAATG | GCGAATGGAA | ATTGTAAGCG | TTAATATTTT | 3840 |
| GTTAAAATTC | GCGTTAAATT  | TTTGTTAAAT | CAGCTCATTT | TTTAACCAAT | AGGCCGAAAT | 3900 |
| CGGCAAAATC | CCTTATAAAT  | CAAAAGAATA | GACCGAGATA | GGGTTGAGTG | TTGTTCCAGT | 3960 |

TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGA CTCCAAC GTCAAAGGGC GAAAAACCGT 4020  
 CTATCAGGGC GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCCTAA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG 4080  
 GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC CGATTTAGAG CTTGACGGGG 4140  
 AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC 4200  
 GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC TTAATGCGCC 4260  
 GCTACAGGGC GCGTCAG 4277

64. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

(A) hosszúság: 4701 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav

szintetikus DNS-oligonukleotid

15 (vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pTZ-L2

(xi) Szekvencia leírása:

AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTTTT 60  
 TCTGCGGCCG CGGCCTATAT GGCCCGGTCC GGTAACTAC GTAGACGTCG AGGATTTTCG 120  
 GTGGGTCAAT GCCGCGCCAG ATCCACATCA GACGGTTAAT CATGCGATAC CAGTGAGGGA 180  
 TGGTTTTACC ATCAAGGGCC GACTGCACAG GCGGTTGTGC GCCGTGATTA AAGCGGCGGA 240  
 CTAGCGTCGA GGTTTCAGGA TGTTTAAAGC GGGGTTTGAA CAGGGTTTCG CTCAGGTTTG 300  
 CCTGTGTCAT GGATGCAGCC TCCAGAATAC TTA CTGGAAA CTATTGTAAC CCGCCTGAAG 360  
 TTAAAAAGAA CAACGCCCCG CAGTGCCAGG CGTTGAAAAG ATTAGCGACC GGAGATTGGC 420  
 GGGACGAATA CGACGCCCAT ATCCACGGC TGTTC AATCC AGGTATCTTG CGGGATATCA 480  
 ACAACATAGT CATCAACCAG CGGACGACCA GCCGGTTTTG CGAAGATGGT GACAAAGTGC 540  
 GCTTTTGGAT ACATTTACG AATCGCAACC GCAGTACCAC CGGTATCCAC CAGGTCATCA 600  
 ATAACGATGA AGCCTTCGCC ATCGCCTTCT GCGCGTTTCA GCACTTTAAG CTCGCGCTGG 660  
 TTGTCGTGAT CGTAGCTGGA AATACAAACG GTATCGACAT GACGAATACC CAGTTCACGC 720  
 GCCAGTAACG CACCCGGTAC CAGACGCCA CGGCTTACGG CAATAATGCC TTTCCATTGT 780  
 TCAGAAGGCA TCAGTCGGCT TCGGAGTTTA CGTGCATGGA TCTGCAACAT GTCCAGGTG 840  
 ACATGTATT TTTGCTCAT GTGAAGTGTC CCAGCCTGTT TATCTACGGC TTAAAAAGTG 900  
 TTCGAGGGGA AAATAGGTTG CGCGAGATTA TAGAGATCTG GCGCACTAAA AACCAGTATT 960  
 TCACATGAGT CCGCGTCTTT TTACGCACTG CCTCTCCCTG ACGCGGGATA AAGTGGTATT 1020  
 CTCAAACATA TCTCGCAAGC CTGTCTTGTTG TCCAAGCTTG GGGATCATCC GTCAGTTTC 1080  
 TTTATGATTC TACTTCCTTA CCGTGCAATA AATTAGAATA TATTTTCTAC TTTTACGAGA 1140  
 AATTAATTAT TGTATTTATT ATTTATGGGT GAAAACTTA CTATAAAAAG CGGGTGGGT 1200  
 TGGAATTAGT GATCAGTTTA TGTATATCGC AACTACCGGC ATATGGCTAT TCGACATCGA 1260  
 GAACATTACC CACATGATAA GAGATTGTAT CAGTTTCGTA GTCTTGAGTA TTGGTATTAC 1320  
 TATATAGTAT ATNNNNNNGG TAACNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 1380  
 NNNNNNNAGA TCTCGATCCG GATATAGTTC CTCCTTTCAG CAAAAAACC CTCAAGACCC 1440

|            |            |            |            |            |             |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| GTTTAGAGGC | CCCAAGGGGT | TATGCTAGTT | ATTGCTCANN | NNNNNNNGT  | CGACTTAATT  | 1500 |
| AATTAGGCCT | CTCGAGCTGC | AGGGATCCAC | TAGTGAGCTC | CCCGGGGAAT | TCCCATGGTA  | 1560 |
| TTATCGTGTT | TTTCAAAGGA | AAAAAACGTC | CCGTGGTTCG | GGGGGCTCTN | NNNNNNNNNN  | 1620 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 1680 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 1740 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 1800 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 1860 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 1920 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 1980 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 2040 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN  | 2100 |
| NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NNNNNNNNNN | NCCGCTAGAG | GGAAACCGTT | GTGGTCTCCC  | 2160 |
| TATAGTGAGT | CGTATTAATT | TCGCGGGATC | GATCGATTAC | GTAGTTAACG | CGGCCGCGGC  | 2220 |
| CTAGCCGGCC | ATAAAAATCT | AGCTGGCGTA | ATAGCGAAGA | GGCCCGCACC | GATCGCCCTT  | 2280 |
| CCCAACAGTT | GCGCAGCCTG | AATGGCGAAT | GGGAAATTGT | AAACGTTAAT | ATTTTGTTAA  | 2340 |
| AATTCGCGTT | AAATTTTTGT | TAAATCAGCT | CATTTTTTAA | CCAATAGGCC | GAAATCGGCA  | 2400 |
| AAATCCCTTA | TAAATCAAAA | GAATAGACCG | AGATAGGGTT | GAGTGTGTGT | CCAGTTTGGA  | 2460 |
| ACAAGAGTCC | ACTATTAAAG | AACGTGGACT | CCAACGTCAA | AGGGCGAAAA | ACCGTCTATC  | 2520 |
| AGGGCGATGG | CCCACTACGT | GAACCATCAC | CCTAATCAAG | TTTTTTGGGG | TCGAGGTGCC  | 2580 |
| GTAAAGCACT | AAATCGGAAC | CCTAAAGGGA | GCCCCGATT  | TAGAGCTTGA | CGGGGAAAGC  | 2640 |
| CGGCGAACGT | GGCGAGAAAG | GAAGGGAAGA | AAGCGAAAGG | AGCGGGCGCT | AGGGCGCTGG  | 2700 |
| CAAGTGTAGC | GGTCACGCTG | CGCGTAACCA | CCACACCCGC | CGCGCTTAAT | GCGCCGCTAC  | 2760 |
| AGGGCGCGTC | AGGTGGCACT | TTTCGGGGAA | ATGTGCGCGG | AACCCCTATT | TGTTTTATTTT | 2820 |
| TCTAAATACA | TTCAAATATG | TATCCGCTCA | TGAGACAATA | ACCCTGATAA | ATGCTTCAAT  | 2880 |
| AATATTGAAA | AAGGAAGAGT | ATGAGTATTC | AACATTTCCG | TGTCGCCCTT | ATTCCCTTTT  | 2940 |
| TTGCGGCATT | TTGCCTTCCT | GTTTTTGCTC | ACCCAGAAAC | GCTGGTGAAA | GTAAAAGATG  | 3000 |
| CTGAAGATCA | GTTGGGTGCA | CGAGTGGGTT | ACATCGAACT | GGATCTCAAC | AGCGGTAAGA  | 3060 |
| TCCTTGAGAG | TTTCGCCCC  | GAAGAACGTT | TTCCAATGAT | GAGCACTTTT | AAAGTTCTGC  | 3120 |
| TATGTGGCGC | GGTATTATCC | CGTGTTGACG | CCGGGCAAGA | GCAACTCGGT | CGCCGCATAC  | 3180 |
| ACTATTCTCA | GAATGACTTG | GTTGAGTACT | CACCACTCAC | AGAAAAGCAT | CTTACGGATG  | 3240 |
| GCATGACAGT | AAGAGAATTA | TGCAGTGCTG | CCATAACCAT | GAGTGATAAC | ACTGCGGCCA  | 3300 |
| ACTTACTTCT | GACAACGATC | GGAGGACCGA | AGGAGCTAAC | CGCTTTTTTG | CACAACATGG  | 3360 |
| GGGATCATGT | AACTCGCCTT | GATCGTTGGG | AACCGGAGCT | GAATGAAGCC | ATACCAAACG  | 3420 |
| ACGAGCGTGA | CACCACGATG | CCTGCAGCAA | TGGCAACAAC | GTTGCGCAAA | CTATTAAGTG  | 3480 |

GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG 3540  
 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG 3600  
 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT 3660  
 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC 3720  
 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT 3780  
 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA 3840  
 TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTC CACTGAGCGT 3900  
 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT 3960  
 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC 4020  
 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC 4080  
 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC 4140  
 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG 4200  
 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGT 4260  
 CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG 4320  
 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG 4380  
 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT 4440  
 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG 4500  
 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT 4560  
 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA 4620  
 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT 4680  
 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA G 4701

65. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 3878 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

(ii) Molekula típusa:

40

(A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav

szintetikus DNS-oligonukleotid

(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón:

pselP-gpt-L2

(xi) Szekvencia leírása:

AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCAATTAA TGCAGCTTTT 60  
 TCTGCGGCCG CGGCCTATAT GGCCCGGTCC GGTAACTAC GTAGACGTCG AGGATTTCGC 120  
 GTGGGTCAAT GCCGCGCCAG ATCCACATCA GACGGTTAAT CATGCGATAC CAGTGAGGGA 180  
 TGGTTTTACC ATCAAGGGCC GACTGCACAG GCGGTTGTGC GCCGTGATTA AAGCGGCGGA 240  
 CTAGCGTCGA GGTTTCAGGA TGTTTAAAGC GGGGTTTGAA CAGGGTTTCG CTCAGGTTTG 300  
 CCTGTGTCAT GGATGCAGCC TCCAGAATAC TTAAGTGGAA CTATTGTAAC CCGCCTGAAG 360  
 TTAAAAAGAA CAACGCCCGG CAGTGCCAGG CGTTGAAAAG ATTAGCGACC GGAGATTGGC 420  
 GGGACGAATA CGACGCCCAT ATCCCACGGC TGTTCAATCC AGGTATCTTG CGGGATATCA 480  
 ACAACATAGT CATCAACCAG CGGACGACCA GCCGGTTTTG CGAAGATGGT GACAAAGTGC 540

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| GCTTTTGGAT ACATTTTCAG AATCGCAACC GCAGTACCAC CGGTATCCAC CAGGTCATCA | 600  |
| ATAACGATGA AGCCTTCGCC ATCGCCTTCT GCGCGTTTCA GCACTTTAAG CTCGCGCTGG | 660  |
| TTGTCGTGAT CGTAGCTGGA AATACAAACG GTATCGACAT GACGAATACC CAGTTCACGC | 720  |
| GCCAGTAACG CACCCGGTAC CAGACCGCCA CGGCTTACGG CAATAATGCC TTTCCATTGT | 780  |
| TCAGAAGGCA TCAGTCGGCT TCGAGTTTA CGTGCATGGA TCTGCAACAT GTCCCAGGTG  | 840  |
| ACGATGTATT TTTCGCTCAT GTGAAGTGTC CCAGCCTGTT TATCTACGGC TTAAAAAGTG | 900  |
| TTGAGGGGA AAATAGGTTG CGCGAGATTA TAGAGATCTG GCGCACTAAA AACCAGTATT  | 960  |
| TCACATGAGT CCGCGTCTTT TTACGCACTG CCTCTCCCTG ACGCGGGATA AAGTGGTATT | 1020 |
| CTCAAACATA TCTCGCAAGC CTGTCTTG TGCAAGCTTG GGGATCATCC GTCAGTGTC    | 1080 |
| TTTATGATTC TACTTCCTTA CCGTGCAATA AATTAGAATA TATTTCTAC TTTTACGAGA  | 1140 |
| AATTAATTAT TGTATTTATT ATTTATGGGT GAAAACTTA CTATAAAAAG CGGGTGGGTT  | 1200 |
| TGGAATTAGT GATCAGTTTA TGTATATCGC AACTACCGGC ATATGATAAA AAGTCGACTT | 1260 |
| AATTAATTAG GCCTCTCGAG CTGCAGGGAT CCACTAGTGA GCTCCCCGGG GAATTCCTAT | 1320 |
| GGAGGCCTTA TTTATATTCC AAAAAAAAAA AATAAAATTT CAATTTTAT CGATTACGTA  | 1380 |
| GTTAACGCGG CCGCGGCCTA GCCGGCCATA AAAATCTAGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC | 1440 |
| CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GGCGAATGGG AAATTGTAAA | 1500 |
| CGTTAATATT TTGTTAAAT TCGCGTTAAA TTTTGTGTTA ATCAGCTCAT TTTTAAACCA  | 1560 |
| ATAGGCCGAA ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG  | 1620 |
| TGTTGTTCCA GTTTGGAACA AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG | 1680 |
| GCGAAAAACC GTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCTT AATCAAGTTT | 1740 |
| TTTGGGGTCG AGGTGCCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCCT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG | 1800 |
| AGCTTGACGG GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC  | 1860 |
| GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC | 1920 |
| GCTTAATGCG CCGCTACAGG GCGCGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCGCGGAAC | 1980 |
| CCCTATTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC | 2040 |
| CTGATAAATG CTTCAATAAT ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT | 2100 |
| CGCCCTTATT CCTTTTTTGG CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT | 2160 |
| GGTGAAAGTA AAAGATGCTG AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA | 2220 |
| TCTCAACAGC GGTAAGATCC TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT CAATGATGAG | 2280 |
| CACTTTTAAA GTTCTGCTAT GTGGCGCGGT ATTATCCCGT GTTGACGCCG GGCAAGAGCA | 2340 |
| ACTCGGTCGC CGCATACACT ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC CAGTCACAGA | 2400 |
| AAAGCATCTT ACGGATGGCA TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG | 2460 |
| TGATAACACT GCGGCCAACT TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC | 2520 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| TTTTTTGCAC AACATGGGGG ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA  | 2580 |
| TGAAGCCATA CCAAACGACG AGCGTGACAC CACGATGCCT GCAGCAATGG CAACAACGTT  | 2640 |
| GCGCAAAC TA TAACTGGCG AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT TAATAGACTG  | 2700 |
| GATGGAGGCG GATAAAGTTG CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTTCCGG CTGGCTGGTT  | 2760 |
| TATTGCTGAT AAATCTGGAG CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG  | 2820 |
| GCCAGATGGT AAGCCCTCCC GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT  | 2880 |
| GGATGAACGA AATAGACAGA TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC ATTGGTAACT  | 2940 |
| GTCAGACCAA GTTTACTCAT ATATACTTTA GATTGATTTA AAACCTTCATT TTTAATTTAA | 3000 |
| AAGGATCTAG GTGAAGATCC TTTTGTGATA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT  | 3060 |
| TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG ACCCCGTA GA AAAGATCAAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT | 3120 |
| TTTTCTGCGC GTAATCTGCT GCTTGCAAAC AAAAAACCA CCGCTACCAG CCGTGGTTTG   | 3180 |
| TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA  | 3240 |
| GATACCAAAT ACTGTCCTTC TAGTG TAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA AGAACTCTGT | 3300 |
| AGCACCGCCT ACATACCTCG CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA  | 3360 |
| TAAGTCGTGT CTTACCGGGT TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC  | 3420 |
| GGGCTGAACG GGGGGTTCGT GCACACAGCC CAGCTTGGAG CGAACGACCT ACACCGAACT  | 3480 |
| GAGATACCTA CAGCGTGAGC ATTGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA  | 3540 |
| CAGGTATCCG GTAAGCGGCA GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG  | 3600 |
| AAACGCCTGG TATCTTTATA GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCGTCGATT  | 3660 |
| TTTGTGATGC TCGTCAGGGG GGCGGAGCCT ATGGAAAAAC GCCAGCAACG CGGCCTTTTT  | 3720 |
| ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT GGCCTTTTGC TCACATGTTT TTTCCTGCGT TATCCCCTGA  | 3780 |
| TTCTGTGGAT AACCGTATTA CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC  | 3840 |
| GACCGAGCGC AGCGAGTCAG TGAGCGAGGA AGCGGAAG                          | 3878 |

66. azonosítási számú szekvencia
- |                              |                          |                                |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| (i) Szekvencia jellemzői:    | (ii) Molekula típusa:    | egyéb nukleinsav               |
| (A) hosszúság: 6474 bázispár | (A) Megnevezés:          | szintetikus DNS-oligonukleotid |
| (B) típus: nukleinsav        | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (C) szál típusa: egyes       | (B) klón:                | pselP-gp160 <sub>MN</sub>      |
| (D) topológia: lineáris      | (xi) Szekvencia leírása: |                                |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTTTT | 60  |
| TCTGCGGCCG CGGCCTATAT GGCCCGGTCC GGTAACTAC GTAGACGTCG AGGATTTCGC  | 120 |
| GTGGGTCAAT GCCGCGCCAG ATCCACATCA GACGGTTAAT CATGCGATAC CAGTGAGGGA | 180 |
| TGGTTTTACC ATCAAGGGCC GACTGCACAG GCGGTTGTGC GCCGTGATTA AAGCGGCGGA | 240 |
| CTAGCGTCGA GGTTTCAGGA TGTTTAAAGC GGGGTTTGAA CAGGGTTTCG CTCAGGTTTG | 300 |
| CCTGTGTCAT GGATGCAGCC TCCAGAATAC TTA CTGTTGTAAC CCGCCTGAAG        | 360 |
| TTAAAAAGAA CAACGCCCGG CAGTGCCAGG CGTTGAAAAG ATTAGCGACC GGAGATTGGC | 420 |

|             |            |             |             |            |             |      |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| GGGACGAATA  | CGACGCCCAT | ATCCCACGGC  | TGTTCAATCC  | AGGTATCTTG | CGGGATATCA  | 480  |
| ACAACATAGT  | CATCAACCAG | CGGACGACCA  | GCCGGTTTTG  | CGAAGATGGT | GACAAAGTGC  | 540  |
| GCTTTTGGAT  | ACATTTACAG | AATCGCAACC  | GCAGTACCAC  | CGGTATCCAC | CAGGTCATCA  | 600  |
| ATAACGATGA  | AGCCTTCGCC | ATCGCCTTCT  | GCGCGTTTCA  | GCACTTTAAG | CTCGCGCTGG  | 660  |
| TTGTCTGTAT  | CGTAGCTGGA | AATACAAACG  | GTATCGACAT  | GACGAATACC | CAGTTCACGC  | 720  |
| GCCAGTAACG  | CACCCGGTAC | CAGACCGCCA  | CGGCTTACGG  | CAATAATGCC | TTTCCATTGT  | 780  |
| TCAGAAGGCA  | TCAGTCGGCT | TGCGAGTTTA  | CGTGCAATGA  | TCTGCAACAT | GTCCCAGGTG  | 840  |
| ACGATGTATT  | TTTCGCTCAT | GTGAAGTGTC  | CCAGCCTGTT  | TATCTACGGC | TTAAAAAGTG  | 900  |
| TTTCAGGGGA  | AAATAGGTTG | CGCGAGATTA  | TAGAGATCTG  | GCGCACTAAA | AACCAGTATT  | 960  |
| TCACATGAGT  | CCGCGTCTTT | TTACGCACTG  | CCTCTCCCTG  | ACGCGGGATA | AAGTGGTATT  | 1020 |
| CTCAAACATA  | TCTCGCAAGC | CTGTCTTGTC  | TCCAAGCTTG  | GGGATCATCC | GTCAGTGTTC  | 1080 |
| TTTATGATTG  | TACTTCCTTA | CCGTGCAATA  | AATTAGAATA  | TATTTTCTAC | TTTTACGAGA  | 1140 |
| AATTAATTAT  | TGTATTTATT | ATTTATGGGT  | GAAAACTTA   | CTATAAAAAG | CGGGTGGGTT  | 1200 |
| TGGAATTAGT  | GATCAGTTTA | TGTATATCGC  | AACTACCGGC  | ATATGATAAA | AAGTCGACTT  | 1260 |
| AATTAATTAG  | GCTGGTTCAG | CTCGTCTCAT  | TCTTTCCCTT  | ACAGTAGGCC | ATCCAGTCAC  | 1320 |
| ACGTTTTGAC  | CATTTGCCAC | CCATCTTATA  | GCAAAGCCCT  | TTCCAAGCCC | TGTCTTATTC  | 1380 |
| TTGTAGGTAT  | GTGGAGAATA | GCTCTACCAG  | CTCTTTGCAG  | TACTTCTATA | ACCCTATCTG  | 1440 |
| TCCCCTCAGC  | TACTGCTATA | GCTGTGGCAT  | TAAGCAAGCT  | AACAGCACTA | CTCTTTAGTT  | 1500 |
| CCTGACTCCA  | ATACTGTAGG | AGATTCCACC  | AATATTTGAG  | GACTTCCCAC | CCCCTGCGTC  | 1560 |
| CCAGAAGTTC  | CACAATCCTC | GCTGCAATCA  | AGAGTAAGTC  | TCTGTGGTGG | TAGCTGAAGA  | 1620 |
| GGAACAGGCT  | CCGCAGGTCG | ACCCAGATAA  | TTGCTAAGAA  | TCCATGCACT | AATCGACCGG  | 1680 |
| ATGTGTCTCT  | GTCTCTCTCT | CCACCTTCTT  | CTTCGATTCC  | TTCGGGCCTG | TCGGGTCCCC  | 1740 |
| TCGGAACCTGG | GGGGCGGGTC | TGCAACGACA  | ATGGTGAGTA  | TCCCTGCCTA | ACTCTATTCA  | 1800 |
| CTATAGAAAG  | TACAGCAAAA | ACTATTCTTA  | AACCTACCAA  | GCCTCCTACT | ATCATTTATGA | 1860 |
| ATATTTTTAT  | ATACCACAGC | CAATTTGTTA  | TGTCAAACCA  | ATTCCACAAA | CTTGCCCAT   | 1920 |
| TATCCAATTG  | CAATAATTCT | TGTTCAATTCT | TTTCTTGTTG  | GGTTTGCGAT | TTTTCTAGTA  | 1980 |
| ATGAGTATAT  | TAAGCTTGTC | TAATTGTCAA  | TTTCTCTTTC  | CCACTGCATC | CAGGTCATGT  | 2040 |
| TATTCCAAAT  | ATCATCCAGA | GATTTATTAC  | TCCAAC TAGC | ATTCCAAGGC | ACAGTAGTGG  | 2100 |
| TGCAAATGAG  | TTTTCCAGAG | CAACCCCAAA  | ACCCAGGAG   | CTGTTGATCC | TTTAGGTATC  | 2160 |
| TTTCCACAGC  | CAGGACTCTT | GCCTGGAGCT  | GCTTGATGCC  | CCAGACTGTG | AGTTGCAACA  | 2220 |
| TATGCTGTTG  | CGCCTCAATG | GCCCTCAGCA  | AATTGTTCTG  | CTGTTGCACT | ATACCAGACA  | 2280 |
| ATAATAGTCT  | GGCCTGTACC | GTCAGCGTCA  | CTGACGCTGC  | GCCCATAGTG | CTTCCTGCTG  | 2340 |
| CTCCTAAGAA  | CCCAAGGAAC | AGAGCTCCTA  | TCGCTGCTCT  | TTTTTCTCTC | TGCACCACTC  | 2400 |
| TTCTCTTTGC  | CTTGGTGGGT | GCTACTCCTA  | ATGGTTCAAT  | TGTTACTACT | TTATATTTAT  | 2460 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ATAATTCACT TCTCCAATTG TCCCTCATAT CTCCTCCTCC AGGTCTGAAG ATCTCGGTGT | 2520 |
| CGTTCGTGTC CGTGTCTTA CCACCATCTC TTGTTAATAG TAGCCCTGTA ATATTTGATG  | 2580 |
| AACATCTAAT TTGTCCTTCA ATGGGAGGGG CATAATTGC TTTTCCTACT TCCTGCCACA  | 2640 |
| TGTTTATAAT TTGTTTTATT TTGCATTGAA GTGTGATATT GTTATTTGAC CCTGTAGTAT | 2700 |
| TATTCOAAGT ATTATTACCA TTCCAAGTAC TATTAAACAG TGGTGATGTA TTACAGTAGA | 2760 |
| AAAATTCCCC TCCACAATTA AAACGTGTGA TTACAATTTT TGGGTCCCCT CCTGAGGATT | 2820 |
| GATTAAAGAC TATTGTTTTA TTCTTAAATT GTTCTTTTAA TTTGCTAACT ATCTGTCTTA | 2880 |
| AAGTGTCAAT CCATTTTGCT CTACTAATGT TACAATGTGC TTGTCTTATA GTTCCTATTA | 2940 |
| TATTTTTTGT TGTATAAAAT GCTCTCCCTG GTCCTATATG TATCCTTTTT CTTTTATTGT | 3000 |
| AGTTGGGTCT TGTACAATTA ATTTGTACAG ATTCATTGAG ATGTACTATG ATGGTTTTAG | 3060 |
| CATTATCAGT GAAATCTCTA GATCTAATTA CTACCTCTTC TTCTGCTAGA CTGCCATTTA | 3120 |
| ACAGCAGTTG AGTTGATACT ACTGGCCTAA TTCCATGTGT ACATTGTACT GTGCTGACAT | 3180 |
| TTTTACATGA TCCTTTTCCA CTGAACTTTT TATCGTTACA TTTTAGAATC GCAAAACCAG | 3240 |
| CCGGGGCACA ATAGTGTATG GGAATTGGCT CAAAGGATAT CTTTGGACAA GCTTGTGTAA | 3300 |
| TGACTGAGGT ATTACAACCT ATCAACCTAT AGCTGGTACT ATCATTATCT ATTGATACTA | 3360 |
| TATCAAGTTT ATAAAGAAGT GCATATCTCT TCTGCATCTT ATCTCTTATG CTTGTGGTGA | 3420 |
| TATTGAAAGA GCAGTTTTTC ATTTCTCCTC CTTTTATTGT TCCCTCGCTA TTACTATTGT | 3480 |
| TATTAGCAGT ACTATTATTG GTATTAGTAG TATTCCTCAA ATCAGTGCAA TTTAAAGTAA | 3540 |
| CACAGAGTGG GGTAAATTTT ACACATGGCT TTAGGCTTTG ATCCCATAAA CTGATTATAT | 3600 |
| CCTCATGCAT CTGTTCTACC ATGTTATTTT TCCACATGTT AAAATTTTCT GTCACATTTA | 3660 |
| CCAATTCTAC TTCTTGTGGG TTGGGGTCTG TGGGTACACA GGCTTGTGTG GCCCAAACAT | 3720 |
| TATGTACCTC TGTATCATAT GCTTTAGCAT CTGATGCACA AAATAGAGTG GTGGTTGCTT | 3780 |
| CTTCCACAC AGGTACCCCA TAATAGACTG TGACCCACAA TTTTCTGTGA GCACTACAGA  | 3840 |
| TCATTAATAA CCCAAGGAGC ATCGTGCCCC ATCCCCACCA GTGCTGATAA TTCCTCCTGA | 3900 |
| TCCCCTTCAC GGCCATGGAG GCCTTATTTA TATTCCAAAA AAAAAAATA AAATTTCAAT  | 3960 |
| TTTTATCGAT TACGTAGTTA ACGCGGCCGC GGCCTAGCCG GCCATAAAAA TCTAGCTGGC | 4020 |
| GTAATAGCGA AGAGGCCCGC ACCGATCGCC CTTCCCAACA GTTGCGCAGC CTGAATGGCG | 4080 |
| AATGGGAAAT TGTAACGTT AATATTTTGT TAAATTCGC GTTAAATTTT TGTTAAATCA   | 4140 |
| GCTCATTTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA | 4200 |
| CCGAGATAGG GTTGAGTGTT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG | 4260 |
| ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA CGTGAACCAT | 4320 |
| CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC ACTAAATCGG AACCTAAAG  | 4380 |
| GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA | 4440 |
| AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT AGCGGTCACG CTGCGCGTAA | 4500 |

|            |             |            |             |             |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| CCACCACACC | CGCCGCGCTT  | AATGCGCCGC | TACAGGGCGC  | GTCAGGTGGC  | ACTTTTCGGG  | 4560 |
| GAAATGTGCG | CGGAACCCCT  | ATTTGTTTAT | TTTTCTAAAT  | ACATTCAAAT  | ATGTATCCGC  | 4620 |
| TCATGAGACA | ATAACCCTGA  | TAAATGCTTC | AATAATATTG  | AAAAAGGAAG  | AGTATGAGTA  | 4680 |
| TTCAACATTT | CCGTGTCGCC  | CTTATTCCCT | TTTTTGCGGC  | ATTTTGCCTT  | CCTGTTTTTG  | 4740 |
| CTCACCAGAG | AACGCTGGTG  | AAAGTAAAAG | ATGCTGAAGA  | TCAGTTGGGT  | GCACGAGTGG  | 4800 |
| GTTACATCGA | ACTGGATCTC  | AACAGCGGTA | AGATCCTTGA  | GAGTTTTTCGC | CCCGAAGAAC  | 4860 |
| GTTTTCCAAT | GATGAGCACT  | TTTAAAGTTC | TGCTATGTGG  | CGCGGTATTA  | TCCCGTGTGG  | 4920 |
| ACGCCGGGCA | AGAGCAACTC  | GGTCGCCGCA | TACACTATTC  | TCAGAATGAC  | TTGGTTGAGT  | 4980 |
| ACTCACCAGT | CACAGAAAAG  | CATCTTACGG | ATGGCATGAC  | AGTAAGAGAA  | TTATGCAGTG  | 5040 |
| CTGCCATAAC | CATGAGTGAT  | AACACTGCGG | CCAACTTACT  | TCTGACAACG  | ATCGGAGGAC  | 5100 |
| CGAAGGAGCT | AACCGCTTTT  | TTGCACAACA | TGGGGGATCA  | TGTAACTCGC  | CTTGATCGTT  | 5160 |
| GGAACCGGA  | GCTGAATGAA  | GCCATACCAA | ACGACGAGCG  | TGACACCAAG  | ATGCCTGCAG  | 5220 |
| CAATGGCAAC | AACGTTGCGC  | AAACTATTAA | CTGGCGAACT  | ACTTACTCTA  | GCTTCCCGGC  | 5280 |
| AACAATTAAT | AGACTGGATG  | GAGGCGGATA | AAGTTGCAGG  | ACCACTTCTG  | CGCTCGGCCC  | 5340 |
| TTCCGGCTGG | CTGGTTTATT  | GCTGATAAAT | CTGGAGCCGG  | TGAGCGTGGG  | TCTCGCGGTA  | 5400 |
| TCATTGCAGC | ACTGGGGCCA  | GATGGTAAGC | CCTCCCGTAT  | CGTAGTTATC  | TACACGACGG  | 5460 |
| GGAGTCAGGC | AACTATGGAT  | GAACGAAATA | GACAGATCGC  | TGAGATAGGT  | GCCTCACTGA  | 5520 |
| TTAAGCATTG | GTAAGTGTCA  | GACCAAGTTT | ACTCATATAT  | ACTTTAGATT  | GATTTAAAAC  | 5580 |
| TTCAATTTTA | ATTTAAAAGG  | ATCTAGGTGA | AGATCCTTTT  | TGATAATCTC  | ATGACCAAAA  | 5640 |
| TCCCTTAACG | TGAGTTTTTCG | TTCCACTGAG | CGTCAGACCC  | CGTAGAAAAG  | ATCAAAGGAT  | 5700 |
| CTTCTTGAGA | TCCTTTTTTTT | CTGCGCGTAA | TCTGCTGCTT  | GCAAACAAAA  | AAACCACCGC  | 5760 |
| TACCAGCGGT | GGTTTGTTTTG | CCGGATCAAG | AGCTACCAAC  | TCTTTTTCCG  | AAGGTAAC TG | 5820 |
| GCTTCAGCAG | AGCGCAGATA  | CCAAATACTG | TCCTTCTAGT  | GTAGCCGTAG  | TTAGGCCACC  | 5880 |
| ACTTCAAGAA | CTCTGTAGCA  | CCGCCTACAT | ACCTCGCTCT  | GCTAATCCTG  | TTACCAGTGG  | 5940 |
| CTGCTGCCAG | TGGCGATAAG  | TCGTGTCTTA | CCGGGTGGA   | CTCAAGACGA  | TAGTTACCGG  | 6000 |
| ATAAGGCGCA | GCGGTCGGGC  | TGAACGGGGG | GTTCTGTGCAC | ACAGCCCAGC  | TTGGAGCGAA  | 6060 |
| CGACCTACAC | CGAACTGAGA  | TACCTACAGC | GTGAGCATTG  | AGAAAGCGCC  | ACGCTTCCCG  | 6120 |
| AAGGGAGAAA | GGCGGACAGG  | TATCCGGTAA | GCGGCAGGGT  | CGGAACAGGA  | GAGCGCACGA  | 6180 |
| GGGAGCTTCC | AGGGGGAAAC  | GCCTGGTATC | TTTATAGTCC  | TGTCGGGTTT  | CGCCACCTCT  | 6240 |
| GACTTGAGCG | TCGATTTTTTG | TGATGCTCGT | CAGGGGGGCG  | GAGCCTATGG  | AAAAACGCCA  | 6300 |
| GCAACGCGGC | CTTTTTACGG  | TTCTTGGCCT | TTTGCTGGCC  | TTTTGCTCAC  | ATGTTCTTTC  | 6360 |
| CTGCGTTATC | CCCTGATTCT  | GTGGATAACC | GTATTACCGC  | CTTTGAGTGA  | GCTGATACCG  | 6420 |
| CTCGCCGCAG | CCGAACGACC  | GAGCGCAGCG | AGTCAGTGAG  | CGAGGAAGCG  | GAAG        | 6474 |

|                                  |               |             |                       |                          |                                |      |
|----------------------------------|---------------|-------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|------|
| 67. azonosítási számú szekvencia |               |             | (ii) Molekula típusa: |                          | egyéb nukleinsav               |      |
| (i) Szekvencia jellemzői:        |               |             | (A) Megnevezés:       |                          | szintetikus DNS-oligonukleotid |      |
| (A) hosszúság:                   | 6811 bázispár |             |                       | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |      |
| (B) típus:                       | nukleinsav    |             | 5                     | (B) klón:                | pN2–gpta ProtS                 |      |
| (C) szál típusa:                 | egyes         |             |                       | (xi) Szekvencia leírása: |                                |      |
| (D) topológia:                   | lineáris      |             |                       |                          |                                |      |
| GTGGCACTTT                       | TCGGGGAAAT    | GTGCGCGGAA  | CCCCTATTTG            | TTTATTTTTC               | TAAATACATT                     | 60   |
| CAAATATGTA                       | TCCGCTCATG    | AGACAATAAC  | CCTGATAAAT            | GCTTCAATAA               | TATTGAAAAA                     | 120  |
| GGAAGAGTAT                       | GAGTATTCAA    | CATTTCCGTG  | TCGCCCTTAT            | TCCCTTTTTT               | GCGGCATTTT                     | 180  |
| GCCTTCCTGT                       | TTTTGCTCAC    | CCAGAAAACGC | TGGTGAAAGT            | AAAAGATGCT               | GAAGATCAGT                     | 240  |
| TGGGTGCACG                       | AGTGGGTTAC    | ATCGAACTGG  | ATCTCAACAG            | CGGTAAGATC               | CTTGAGAGTT                     | 300  |
| TTCGCCCCGA                       | AGAACGTTTT    | CCAATGATGA  | GCACTTTTAA            | AGTTCTGCTA               | TGTGGCGCGG                     | 360  |
| TATTATCCCG                       | TATTGACGCC    | GGGCAAGAGC  | AACTCGGTG             | CCGCATACAC               | TATTCTCAGA                     | 420  |
| ATGACTTGGT                       | TGAGTACTCA    | CCAGTCACAG  | AAAAGCATCT            | TACGGATGGC               | ATGACAGTAA                     | 480  |
| GAGAATTATG                       | CAGTGCTGCC    | ATAACCATGA  | GTGATAACAC            | TGCGGCCAAC               | TTACTTCTGA                     | 540  |
| CAACGATCGG                       | AGGACCGAAG    | GAGCTAACCG  | CTTTTTTGCA            | CAACATGGGG               | GATCATGTAA                     | 600  |
| CTCGCCTTGA                       | TCGTTGGGAA    | CCGGAGCTGA  | ATGAAGCCAT            | ACCAAACGAC               | GAGCGTGACA                     | 660  |
| CCACGATGCC                       | TGTAGCAATG    | GCAACAACGT  | TGCGCAAAC             | ATTAAGTGGC               | GAAGTACTTA                     | 720  |
| CTCTAGCTTC                       | CCGGCAACAA    | TTAATAGACT  | GGATGGAGGC            | GGATAAAGTT               | GCAGGACCAC                     | 780  |
| TTCTGCGCTC                       | GGCCCTTCCG    | GCTGGCTGGT  | TTATTGCTGA            | TAAATCTGGA               | GCCGGTGAGC                     | 840  |
| GTGGGTCTCG                       | CGGTATCATT    | GCAGCACTGG  | GGCCAGATGG            | TAAGCCCTCC               | CGTATCGTAG                     | 900  |
| TTATCTACAC                       | GACGGGGAGT    | CAGGCAACTA  | TGGATGAACG            | AAATAGACAG               | ATCGCTGAGA                     | 960  |
| TAGGTGCCTC                       | ACTGATTAAG    | CATTGGTAAC  | TGTCAGACCA            | AGTTTACTCA               | TATATACTTT                     | 1020 |
| AGATTGATTT                       | AAAACCTTCAT   | TTTTAATTTA  | AAAGGATCTA            | GGTGAAGATC               | CTTTTTGATA                     | 1080 |
| ATCTCATGAC                       | CAAAATCCCT    | TAACGTGAGT  | TTTCGTTCCA            | CTGAGCGTCA               | GACCCCGTAG                     | 1140 |
| AAAAGATCAA                       | AGGATCTTCT    | TGAGATCCTT  | TTTTTCTGCG            | CGTAATCTGC               | TGCTTGCAAA                     | 1200 |
| CAAAAAAACC                       | ACCGCTACCA    | GCGGTGGTTT  | GTTTGCCGGA            | TCAAGAGCTA               | CCAAGTCTTT                     | 1260 |
| TTCCGAAGGT                       | AACTGGCTTC    | AGCAGAGCGC  | AGATACCAA             | TACTGTCTTT               | CTAGTGTAGC                     | 1320 |
| CGTAGTTAGG                       | CCACCACTTC    | AAGAAGTCTG  | TAGCACCGCC            | TACATACCTC               | GCTCTGCTAA                     | 1380 |
| TCCTGTTACC                       | AGTGGCTGCT    | GCCAGTGGCG  | ATAAGTCGTG            | TCTTACCGGG               | TTGGACTCAA                     | 1440 |
| GACGATAGTT                       | ACCGGATAAG    | GCGCAGCGGT  | CGGGCTGAAC            | GGGGGGTTCG               | TGCACACAGC                     | 1500 |
| CCAGCTTGGA                       | GCGAACGACC    | TACACCGAAC  | TGAGATACCT            | ACAGCGTGAG               | CTATGAGAAA                     | 1560 |
| GCGCCACGCT                       | TCCCGAAGGG    | AGAAAGGCGG  | ACAGGTATCC            | GGTAAGCGGC               | AGGGTCGGAA                     | 1620 |
| CAGGAGAGCG                       | CACGAGGGAG    | CTTCCAGGGG  | GAAACGCCTG            | GTATCTTTAT               | AGTCCTGTCTG                    | 1680 |
| GGTTTCGCCA                       | CCTCTGACTT    | GAGCGTCGAT  | TTTTGTGATG            | CTCGTCAGGG               | GGGCGGAGCC                     | 1740 |
| TATGGAAAAA                       | CGCCAGCAAC    | GCGGCCCTTT  | TACGGTTCCT            | GGCCTTTTGC               | TGGCCTTTTG                     | 1800 |

|            |            |            |            |            |             |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| CTCACATGTT | CTTTCCTGCG | TTATCCCCTG | ATTCTGTGGA | TAACCGTATT | ACCGCCTTTG  | 1860 |
| AGTGAGCTGA | TACCGCTCGC | CGCAGCCGAA | CGACCGAGCG | CAGCGAGTCA | GTGAGCGAGG  | 1920 |
| AAGCGGAAGA | GCGCCCAATA | CGCAAACCGC | CTCTCCCCGC | GCGTTGGCCG | ATTCAATTAAT | 1980 |
| GCAGCTGGCA | CGACAGGTTT | CCCGACTGGA | AAGCGGGCAG | TGAGCGCAAC | GCAATTAATG  | 2040 |
| TGAGTTAGCT | CACTCATTAG | GCACCCCAGG | CTTTACACTT | TATGCTTCCG | GCTCGTATGT  | 2100 |
| TGTGTGGAAT | TGTGAGCGGA | TAACAATTTT | ACACAGGAAA | CAGCTATGAC | CATGATTACG  | 2160 |
| CCAAGCGCGC | AATTAACCTT | CACTAAAGGG | AACAAAAGCT | GGAGCTCCAC | CGCGGTGGCG  | 2220 |
| GCCGCGTCGA | CAGAAAAATT | AATTAATTAT | GGCCTCTCGA | GCTGCAGCTG | CCAAGAAGAA  | 2280 |
| GATTCTGTG  | CTGCTCTCAG | GAAAAATATG | CCCACCTGTT | TTCTAATTCA | ATAAAGATAC  | 2340 |
| TGGTTTAAAT | GTGAAGCCAC | ACAAGAGAAA | GATGAAGCCA | AAGCTGGTCC | CCCTGAGGAA  | 2400 |
| TTGTTTTGAA | ATAAGGCATT | AGGACCCTCC | ATTCAATTCA | TATTTAATAG | ACCACCATCT  | 2460 |
| CTTCTGCCTT | CATCAGGAAA | AAAACAAAAA | CATAAACAAA | ATAGTATCTG | CCTATGATTA  | 2520 |
| ATAGTATTTA | ATTACACGCA | CTTTTGTTTG | AGTTTACTTC | CTTGCTTTCT | GAAAAAAACA  | 2580 |
| TAGGTATTTA | GACACTAGTT | CATGATGATA | AAATTAAAAA | TTTAGTTTTA | CAAACAAAAA  | 2640 |
| TTGAACTGT  | CATTTGTAGG | AAAAAAATTC | AAATTTAAAA | TTGTTATTTT | TCACTATTCT  | 2700 |
| TAGATAGCAA | GAGAAGTAAG | AATTTCTTTA | CTGTGATTTA | TATCACAACA | GAATTTTTTT  | 2760 |
| CCTTGACAAA | GGACCTTTTA | AAAATCCCAG | GAAAGGACCA | CAAATAATC  | AAAGACTGCA  | 2820 |
| CATTGTAAAT | AAAACCCTTC | AGCTGTTATT | GAAACATAAG | TATAATTACA | CACAAGGAAA  | 2880 |
| AGGTATTATA | AGCAGAGAAA | AGATGCCTTA | AGAATTCCTT | GTCTTTTTCC | AAACTGATGG  | 2940 |
| ACATGAGTGA | GCTCTAATAT | CATTATGTTT | AGAAATGGCT | TCATCCAGAT | CCAAGTGTAC  | 3000 |
| ACCATTAATA | TTCACCTCCA | TGCAGCCATT | ATAAAAGGCA | TTCACCTGGT | TGGCACTGAA  | 3060 |
| TGGAACATCT | GGAAGGCCAC | CCAGGTATGT | GGCCACTTTT | GCTTTTCATT | GCTTTGTCCA  | 3120 |
| GACGGCAAGT | TGTCTTTGAA | GGTCTTCATG | GGAGATGGTT | TCTATTTTAA | GTGGTGTGCA  | 3180 |
| CAACTCCAGA | TTGTTTCTGT | TGACTCTAAA | TTCCAGATGA | GATTGTTGAT | CGGAACATAG  | 3240 |
| ACTTAGGGCC | TGTATCCGAT | ATATTACAGT | ATTTTCAACA | GATAACAGAA | TATCCTGTGA  | 3300 |
| TTTTTCAGAG | GTGGAGTCCA | CCAAGGACAC | AGCAAAGGGC | ACTGTGTTGT | TACCAGAAAC  | 3360 |
| CAAGGCAAGC | ATAACACCAG | TGCCCCGTGA | TGGACGAATA | TTCAAGGTCA | CATTTACATG  | 3420 |
| CCAACCCTCA | GCACTGGATA | CATTATTATA | ATCTATGTGA | AATTGAGCAA | TTCCAGAACC  | 3480 |
| AGGATAGTAG | GAGCCCTTCT | CCACAGTAAC | CAGGCAATGC | TTATTTTGTT | TTTCTTGAAT  | 3540 |
| AATTTCTTTT | ATTCCAGAAG | CTCCTTGCTT | CATCAAATTC | CAGCTTCGTA | TACATCCATC  | 3600 |
| TAGACGAGGG | TTAATCGGTT | TAATGAGTTC | ACTTTCCACT | TTCCGAGGGA | ATCCTGCAAA  | 3660 |
| GTATACTTTG | GTTTCCAGCA | ATCCATTTTC | CGGCTTAAAA | AGGGGTCCAG | GTTTATTTAT  | 3720 |
| ATCCATCACA | GCTTCTTTAG | CTATTTTAAT | GCTAATACTA | TGTTCTAATT | CTTCCACAGA  | 3780 |
| CACCATATTC | CATAGACCAT | TATTAATAAC | ATCACCTCCA | GTTGTGATTT | TGGATGTATG  | 3840 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| TTCATTCTTA AGCTGAACTT CAATCTTTCC ACCACGAAGT GCAATCAGGA GCCACGCTGA  | 3900 |
| GTGATCGATA GATTCTGCGT ACAGTATCAC GCCTTCTGAA TCATATGTCC GGAAATCAAA  | 3960 |
| TTCTGCTGAA AATCTGCTGA TTTCTGGCAA ACGAAATTTT AAATATAAAA CAACCCCTGC  | 4020 |
| AAACTGCTCC GCCAAGTAAA GTAATTCATA CTTTGTGTCA AGGTTCAAGG GAAGGCACAC  | 4080 |
| TGAAACAACC TCACAACCTT TCTGATCTTG GGCAAGTTTG AATCCTTTCT TCCCATCACA  | 4140 |
| ATAGCAAGTG TAACCTCCAG GGTAATTGAC ACAAAGCTGA GCACACATGT TCTCAGAGCA  | 4200 |
| TTCATCTATA TCTTCACAAG ACTTTGATTT GAGATTATAT CTGTAGCCTT CGGGGCATTC  | 4260 |
| ACATTCAAAA TCTCCTGGGA TGTTCCTTGA CACAGCTGTG CCACAAATGC TTGGCTTCAA  | 4320 |
| AGAGCATTCA TCCACATCTT TACAATCTTT CTTATTTGAA AGCATAACAA AACCATTTTT  | 4380 |
| ACAGGAACAG TGGTAACTTC CAGGTGTATT ATCACAAATT TGA CTGCAAC CTCCATTTAT | 4440 |
| ATTTGAGGGA TCTTTGCATT CATTTATGTC AAATTCACAC TTTTCTCCTT GCCAACCTGG  | 4500 |
| TTTACAAGTG CAAGTAAAG AAGCTTTTCC ATCTTTGCAG CTCATATATC CATCTTCATT   | 4560 |
| GCATGGCAGA GGACTACACT GGTCTGGAAT GGCATTGACA CAGCTTCTTA GGTGAGGATA  | 4620 |
| AGCATTAGTT GACTGACGTG CAGCAGTGAA TAACCCAGTT TGAAAAGAGC GAAGACAAAC  | 4680 |
| TAAGTATTTT GGATAAAAAT AATCCGTTTC CGGGTCATTT TCAAAGACCT CCCTGGCTTC  | 4740 |
| TTCTTTATTG CACAGTTCTT CGATGCATTC TCTTTCAAGA TTACCCGTGT TGGTTTCTTC  | 4800 |
| AAGTAAAGAA TTTGCACGAC GCTTCCTAAC CAGGACTTGT GAAGCCTGTT GCTTTGACAA  | 4860 |
| AAAGTTTGCC TCTGAGACGG GAAGCACTAG GAGGAGACAC GCCAGCAACG CCCCAGCG    | 4920 |
| CCCACCCAGG ACCCCCATGG AGGCCTTATT TATATTCCAA AAAAAAAAAA TAAATTTCA   | 4980 |
| ATTTTTAGAT CCCCCAATT AAGGGTACCG CCTCGACATC TATATACTAT ATAGTAATAC   | 5040 |
| CAATACTCAA GACTACGAAA CTGATACAAT CTCTTATCAT GTGGGTAATG TTCTCGATGT  | 5100 |
| CGAATAGCCA TATGCCGGTA GTTGCATAT ACATAAACTG ATCACTAATT CCAAACCCAC   | 5160 |
| CCGCTTTTTA TAGTAAGTTT TTCACCCATA AATAATAAAT ACAATAATTA ATTTCTCGTA  | 5220 |
| AAAGTAGAAA ATATATTCTA ATTTATTGCA CGGTAAGGAA GTAGAATCAT AAAGAACAGT  | 5280 |
| GACGGATGAT CCCCAAGCTT GGACACAAGA CAGGCTTGCG AGATATGTTT GAGAATACCA  | 5340 |
| CTTTATCCCG CGTCAGGGAG AGGCAGTGCG TAAAAGACG CGGACTCATG TGAAATACTG   | 5400 |
| GTTTTTAGTG CGCCAGATCT CTATAATCTC GCGCAACCTA TTTTCCCCTC GAACACTTTT  | 5460 |
| TAAGCCGTAG ATAAACAGGC TGGGACACTT CACATGAGCG AAAAATACAT CGTCACCTGG  | 5520 |
| GACATGTTGC AGATCCATGC ACGTAACTC GCAAGCCGAC TGATGCCTTC TGAACAATGG   | 5580 |
| AAAGGCATTA TTGCCGTAAG CCGTGGCGGT CTGGTACCGG GTGCGTTACT GGCGCGTGAA  | 5640 |
| CTGGGTATTC GTCATGTCGA TACCGTTTGT ATTTCCAGCT ACGATCACGA CAACCAGCGC  | 5700 |
| GAGCTTAAAG TGCTGAAACG CGCAGAAGGC GATGGCGAAG GCTTCATCGT TATTGATGAC  | 5760 |
| CTGGTGGATA CCGGTGGTAC TGCGGTGCG ATTCGTGAAA TGTATCCAAA AGCGCACTTT   | 5820 |
| GTCACCATCT TCGCAAAACC GGCTGGTCGT CCGCTGGTTG ATGACTATGT TGTTGATATC  | 5880 |

CCGCAAGATA CCTGGATTGA ACAGCCGTGG GATATGGGCG TCGTATTCGT CCCGCCAATC 5940  
 TCCGGTCGCT AATCTTTTCA ACGCCTGGCA CTGCCGGGCG TTGTTCTTTT TAACTTCAGG 6000  
 CGGGTTACAA TAGTTTCCAG TAAGTATTCT GGAGGCTGCA TCCATGACAC AGGCAAACCT 6060  
 GAGCGAAACC CTGTTCAAAC CCCGCTTTGG GCTGCAGGAA TTCGATATCA AGCTTATCGA 6120  
 TACCGTCGCG GCCGCGACCT CGAGGGGGGG CCCGGTACCC AATTCGCCCT ATAGTGAGTC 6180  
 GTATTACGCG CGCTCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT 6240  
 TACCCAACCTT AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA 6300  
 GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGAAATTGTA 6360  
 AGCGTTAATA TTTTGTTAAA ATTTCGCGTTA AATTTTGTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAAC 6420  
 CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG 6480  
 AGTGTGTGTT CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA 6540  
 GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC CTAATCAAGT 6600  
 TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT 6660  
 AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA 6720  
 GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGATAGC GTACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC 6780  
 GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCA G 6811

68. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői: 30 (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) hosszúság: 27 bázispár (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (B) típus: nukleinsav (vii) Közvetlen forrás:  
 (C) szál típusa: egyes (B) klón: oProtS1  
 (D) topológia: lineáris (xi) Szekvencia leírása:

ACCCAGGACC GCCATGGCGA AGCGCGC 27

69. azonosítási számú szekvencia  
 (i) Szekvencia jellemzői: 40 (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
 (A) hosszúság: 6926 bázispár (A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
 (B) típus: nukleinsav (vii) Közvetlen forrás:  
 (C) szál típusa: egyes (B) klón: pP2-gp160<sub>MN</sub>  
 (D) topológia: lineáris (xi) Szekvencia leírása:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT 60  
 CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA 120  
 GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT 180  
 GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT 240  
 TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT 300  
 TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG 360  
 TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTG CCGCATACAC TATTCTCAGA 420  
 ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA 480  
 GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTAATTCTGA 540  
 CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA 600

|            |             |            |             |            |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| CTCGCCTTGA | TCGTTGGGAA  | CCGGAGCTGA | ATGAAGCCAT  | ACCAAACGAC | GAGCGTGACA  | 660  |
| CCACGATGCC | TGTAGCAATG  | GCAACAACGT | TGCGCAAAC   | ATTAAGTGGC | GAAGTACTTA  | 720  |
| CTCTAGCTTC | CCGGCAACAA  | TTAATAGACT | GGATGGAGGC  | GGATAAAGTT | GCAGGACCAC  | 780  |
| TTCTGCGCTC | GGCCCTTCCG  | GCTGGCTGGT | TTATTGCTGA  | TAAATCTGGA | GCCGGTGAGC  | 840  |
| GTGGGTCTCG | CGGTATCATT  | GCAGCACTGG | GGCCAGATGG  | TAAGCCCTCC | CGTATCGTAG  | 900  |
| TTATCTACAC | GACGGGGAGT  | CAGGCAACTA | TGGATGAACG  | AAATAGACAG | ATCGCTGAGA  | 960  |
| TAGGTGCCTC | ACTGATTAAG  | CATTGGTAAC | TGTCAGACCA  | AGTTTACTCA | TATATACTTT  | 1020 |
| AGATTGATTT | AAAACCTTCAT | TTTTAATTTA | AAAGGATCTA  | GGTGAAGATC | CTTTTTGATA  | 1080 |
| ATCTCATGAC | CAAAATCCCT  | TAACGTGAGT | TTTCGTTCCA  | CTGAGCGTCA | GACCCCGTAG  | 1140 |
| AAAAGATCAA | AGGATCTTCT  | TGAGATCCTT | TTTTTCTGCG  | CGTAATCTGC | TGCTTGCAAA  | 1200 |
| CAAAAAACC  | ACCGCTACCA  | GCGGTGGTTT | GTTTGCCGGA  | TCAAGAGCTA | CCAACTCTTT  | 1260 |
| TTCCGAAGGT | AAGTGGCTTC  | AGCAGAGCGC | AGATACCAAA  | TACTGTCCTT | CTAGTGTAGC  | 1320 |
| CGTAGTTAGG | CCACCACTTC  | AAGAACTCTG | TAGCACC GCC | TACATACCTC | GCTCTGCTAA  | 1380 |
| TCCTGTTACC | AGTGGCTGCT  | GCCAGTGGCG | ATAAGTCGTG  | TCTTACCGGG | TTGGACTCAA  | 1440 |
| GACGATAGTT | ACCGGATAAG  | GCGCAGCGGT | CGGGCTGAAC  | GGGGGGTTCG | TGCACACAGC  | 1500 |
| CCAGCTTGGG | GCGAACGACC  | TACACCGAAC | TGAGATACCT  | ACAGCGTGAG | CTATGAGAAA  | 1560 |
| GCGCCACGCT | TCCCGAAGGG  | AGAAAGGCGG | ACAGGTATCC  | GCTAAGCGGC | AGGGTCGGAA  | 1620 |
| CAGGAGAGCG | CACGAGGGAG  | CTTCCAGGGG | GAAACGCTTG  | GTATCTTTAT | AGTCCGTGCG  | 1680 |
| GCTTTCGCCA | CCTCTGACTT  | GAGCGTCGAT | TTTTGTGATG  | CTGCTCAGGG | GGGCGGAGCC  | 1740 |
| TATGGAAAA  | CGCCAGCAAC  | GCGGCTTTTT | TACGGTTCTT  | GGCCTTTTGC | TGGCCTTTTG  | 1800 |
| CTCACATGTT | CTTTCCTGCG  | TTATCCCTTG | ATTCTGTGGA  | TAACGTTATT | ACCGCCTTTG  | 1860 |
| AGTGAAGCTG | TACCGCTCGC  | CGCAGCGGAA | CGACCGAGCG  | CAGCGAGTCA | GTTAGCGAGG  | 1920 |
| AAGCGGAGG  | GCGCCCAATA  | CGCAACCGGC | CTCTCCCGGC  | GCGTTGGCCG | ATTCAATTAAT | 1980 |
| GCACTGCGCA | CGACAGGTTT  | CCGACTGGA  | AAGCGGGCAG  | TGAGCGCAAC | GCAATTAATG  | 2040 |
| TGAGTTAGCT | CACCTCATTA  | GCACCTCAGG | CTTTCACACTT | TATGCTTCCG | GCTCCTATGT  | 2100 |
| TGTGTGGAA  | TGTGAGCGGA  | TAACAATTC  | ACACAGGAAA  | CAGCTATGAC | CATGATTACG  | 2160 |
| CCAAGCGCGC | AATTAACCTT  | CACTAAGGGG | AACAAGAGCT  | GGAGCTCCAC | CGCGGTGGCG  | 2220 |
| GCCGCTCTAG | CCCGGGCTAG  | AACTAGTGGG | TCCCCCAAG   | CGGGTTTGA  | ACAGGGTTTC  | 2280 |
| GCTCAGGTTT | GCCTGTGTCA  | TGGATGCGAG | CTCCAGAAAT  | CTTACTGAAA | ACTATTGAAA  | 2340 |
| CCCGCTGAA  | GTTAAAAAGA  | ACAACGCCCC | GCACTGCCAG  | GCGTTGAAAA | GATTAGCGAC  | 2400 |
| CGGAGATTGG | CGGACGAAT   | ACGACGCCCC | TATCCGAGCG  | CTGTTCAATC | CAGGTATCTT  | 2460 |
| GCGGGATATC | AACAACATAG  | TCATCAACCA | GCGGACGACC  | AGCCGGTTTT | GCGAAGATGG  | 2520 |
| TGACAAAGTG | CGCTTTTGGG  | TACATTTTAC | GAATCGCAAC  | CGGAGTACCA | CCGATATCCA  | 2580 |
| CGAGGTCATC | AATAACGATG  | AAGCCTTCCG | CATCGCCTTC  | TGCGCGTTTC | AGCACTTTAA  | 2640 |

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| GCTCGCGCTG | GTTTCTCGTA | TCGTAGCTGG | AAATACAAAC | GGTATCGACA | TGACGAATAC | 2700 |
| CCAGTTTCAG | CGCCASTAAC | GCACCCCGTA | CCAGACCCCC | ACCGCTTACG | GCAATAATGC | 2760 |
| CTTTCCATTG | TTCAAAAGGC | ATCAGTCGGC | TTGCGAGTTT | ACGTGCATGG | ATCTGCAACA | 2820 |
| TGTCCCGAGT | GACGATGTAT | TTTTCGCTCA | TGTGAAGTGT | CCGAGCCTGT | TTATCTACGG | 2880 |
| CTTAAAAAGT | GTTTCGAGGG | AAAATAGGTT | GCGCGAGATT | ATAGAGATCT | GGGCACTAA  | 2940 |
| AAACCAATAT | TTCAATGAG  | TCCGCGTCTT | TTTACGCACT | GCCTCTCCCT | GACGCGGGAT | 3000 |
| AAAGTGGTAT | TCTCAAACAT | ATCTCGCAAG | CCTGTCTTGT | GTCCAGCCTT | GGGGATCATC | 3060 |
| CGTCACTGTT | CTTTATGATT | CTACTTCCTT | ACCGTGCAAT | AAATTAGAAT | ATATTTTCTA | 3120 |
| CTTTTACGAG | AAATTAATTA | TTGTATTTAT | TATTTATGGG | TGAAAACTT  | ACTATAAAAA | 3180 |
| GCGGCTGGGT | TTGGAATTAG | TGATCAGTTT | ATGTATATCG | CAACTACCGG | CATATGGCTA | 3240 |
| TTGACATCG  | AGAACATCAC | CCACATGATA | AGAGATTGTA | TCAGTTTCGT | AGTCTTGAAT | 3300 |
| ATTGGTATTA | CTATATAGTA | TATAGATGTC | GAGGCGGTAC | CCTTAAGTTG | GGCTGCAGTT | 3360 |
| GTTAGAGCTT | GGTATAGCGG | ACAACTAAGT | AATTGTAAAG | AAGAAACGA  | AACTATCAAA | 3420 |
| ACCGTTTATG | AAATGATAGA | AAAAGATA   | TAAATAATCC | TGTATTTTAT | TTTAAGTAAC | 3480 |
| AGTAATAATA | TGATAGAAA  | ATACTATTTT | TTATAGCCTA | TAAATCGTTC | CTCATGAGAG | 3540 |
| TGAAGGGGAT | CAGGAGGAAT | TATCAGCACT | GGTGGGGATG | GGGCACGATG | CTCCTTGGGT | 3600 |
| TATTAATGAT | CTGTAGTGCT | ACAGAAAAAT | TGTGGGTCAC | AGTCTATTAT | GGGGTACCTG | 3660 |
| TGTGGAAAGA | AGCAACCACC | ACTCTATTTT | GTGCATCAGA | TGCTAAAGCA | TATGATACAG | 3720 |
| AGGTACATAA | TGTTTGGGCC | ACACAAGCCT | GTGTACCCAC | AGACCCCAAC | CCACAAGAAG | 3780 |
| TAGAATTGGT | AAATGTGACA | GAAAATTTTA | ACATGTGGAA | AAATAACATG | GTAGAACAGA | 3840 |
| TGCATGAGGA | TATAATCAGT | TTATGGGATC | AAAGCCTAAA | GCCATGTGTA | AAATTAACCC | 3900 |
| CACTCTGTGT | TACTTTAAAT | TGCACTGATT | TGAGGAATAC | TACTAATACC | AATAATAGTA | 3960 |
| CTGCTAATAA | CAATAGTAAT | AGCGAGGGAA | CAATAAAGGG | AGGAGAAATG | AAAAACTGCT | 4020 |
| CTTTCAATAT | CACCACAAGC | ATAAGAGATA | AGATGCAGAA | AGAATATGCA | CTTCTTTATA | 4080 |
| AACTTGATAT | AGTATCAATA | GATAATGATA | GTACCAGCTA | TAGGTTGATA | AGTTGTAATA | 4140 |
| CCTCAGTCAT | TACACAAGCT | TGTCCAAAAG | TATCCTTTGA | GCCAATTCCC | ATACACTATT | 4200 |
| GTGCCCCGGC | TGGTTTTGCG | ATTCTAAAAT | GTAACGATAA | AAAGTTCAGT | GGAAAAGGAT | 4260 |
| CATGTAAAAA | TGTCAGCACA | GTACAATGTA | CACATGGAAT | TAGGCCAGTA | GTATCAACTC | 4320 |
| AACTGCTGTT | AAATGGCAGT | CTAGCAGAAG | AAGAGGTAGT | AATTAGATCT | GAGAATTTCA | 4380 |
| CTGATAATGC | TAAAACCATC | ATAGTACATC | TGAATGAATC | TGTACAAATT | AATTGTACAA | 4440 |
| GACCCAATA  | CAATAAAAGA | AAAAGGATAC | ATATAGGACC | AGGGAGAGCA | TTTTATACAA | 4500 |
| CAAAAAATAT | AATAGGAACT | ATAAGACAAG | CACATTGTAA | CATTAGTAGA | GCAAAATGGA | 4560 |
| ATGACACTTT | AAGACAGATA | GTTAGCAAAT | TAAAAGAACA | ATTTAAGAAT | AAAACAATAG | 4620 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| TCTTTAATCA ATCCTCAGGA GGGGACCCAG AAATTGTAAT GCACAGTTTT AATTGTGGAG  | 4680 |
| GGGAATTTTT CTACTGTAAT ACATCACCAC TGTTTAATAG TACTTGGAAT GGTAATAATA  | 4740 |
| CTTGGAATAA TACTACAGGG TCAAATAACA ATATCACACT TCAATGCAAA ATAAAACAAA  | 4800 |
| TTATAAACAT GTGGCAGGAA GTAGGAAAAG CAATGTATGC CCCTCCCATT GAAGGACAAA  | 4860 |
| TTAGATGTTT ATCAAATATT ACAGGGCTAC TATTAACAAG AGATGGTGGT AAGGACACGG  | 4920 |
| ACACGAACGA CACCGAGATC TTCAGACCTG GAGGAGGAGA TATGAGGGAC AATTGGAGAA  | 4980 |
| GTGAATTATA TAAATATAAA GTAGTAACAA TTGAACCATT AGGAGTAGCA CCCACCAAGG  | 5040 |
| CAAAGAGAAG AGTGGTGCAG AGAGAAAAAA GAGCAGCGAT AGGAGCTCTG TTCCTTGGGT  | 5100 |
| TCTTAGGAGC AGCAGGAAGC ACTATGGGCG CAGCGTCAGT GACGCTGACG GTACAGGCCA  | 5160 |
| GACTATTATT GTCTGGTATA GTGCAACAGC AGAACAATTT GCTGAGGGCC ATTGAGGCGC  | 5220 |
| AACAGCATAT GTTGCAACTC ACAGTCTGGG GCATCAAGCA GCTCCAGGCA AGAGTCCTGG  | 5280 |
| CTGTGGAAAG ATACCTAAAG GATCAACAGC TCCTGGGGTT TTGGGGTTGC TCTGAAAAC   | 5340 |
| TCATTTGCAC CACTACTGTG CCTTGGAATG CTAGTTGGAG TAATAAATCT CTGGATGATA  | 5400 |
| TTTGGAATAA CATGACCTGG ATGCAGTGGG AAAGAGAAAT TGACAATTAC ACAAGCTTAA  | 5460 |
| TATACTCATT ACTAGAAAAA TCGCAAACCC AACAAGAAAA GAATGAACAA GAATTATTGG  | 5520 |
| AATTGGATAA ATGGGCAAGT TTGTGGAATT GGTTTGACAT AACAAATTGG CTGTGGTATA  | 5580 |
| TAAAAATATT CATAATGATA GTAGGAGGCT TGGTAGGTTT AAGAATAGTT TTTGCTGTAC  | 5640 |
| TTTCTATAGT GAATAGAGTT AGGCAGGGAT ACTCACCATT GTCGTTGCAG ACCCGCCCCC  | 5700 |
| CAGTTCGAG GGGACCCGAC AGGCCCGAAG GAATCGAAGA AGAAGGTGGA GAGAGAGACA   | 5760 |
| GAGACACATC CGGTCGATTA GTGCATGGAT TCTTAGCAAT TATCTGGGTC GACCTGCGGA  | 5820 |
| GCCTGTTTCT CTTCAGCTAC CACCACAGAG ACTTACTCTT GATTGCAGCG AGGATTGTGG  | 5880 |
| AACTTCTGGG ACGCAGGGGG TGGGAAGTCC TCAAATATTG GTGGAATCTC CTACAGTATT  | 5940 |
| GGAGTCAGGA ACTAAAGAGT AGTGCTGTTA GCTTGCTTAA TGCCACAGCT ATAGCAGTAG  | 6000 |
| CTGAGGGGAC AGATAGGGTT ATAGAAGTAC TGCAAAGAGC TGGTAGAGCT ATTCTCCACA  | 6060 |
| TACCTACAAG AATAAGACAG GGCTTGGAAG GGGCTTTGCT ATAAGATGGG TGGCAAATGG  | 6120 |
| TCAAAACGTG TGACTGGATG GCCTACTGTA AGGGAAAGAA TGAGACGAGC TGAACCAGAA  | 6180 |
| CGAATTCCAT GGCCCGGGAA GGCTTCGGAC CGGGCCCCGC CATATAGGCC AGCGATACCG  | 6240 |
| TCGCGGCCGC GACCTCGAGG GGGGGCCCCG TACCCAATTC GCCCTATAGT GAGTCGTATT  | 6300 |
| ACGCGCGCTC ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCT GGC GTTACCC | 6360 |
| AACTTAATCG CCTTGACGCA CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCC   | 6420 |
| GCACCGATCG CCCTTCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGAAA TTGTAAGCGT  | 6480 |
| TAATATTTTG TTAATAATCG CGTTAAATTT TTGTTAAATC AGCTCATTTT TTAACCAATA  | 6540 |
| GGCCGAAATC GGCAAATCC CTTATAAATC AAAAGAATAG ACCGAGATAG GGTGAGTGT    | 6600 |
| TGTTCCAGTT TGGAACAAGA GTCCACTATT AAAGAACGTG GACTCCAACG TCAAAGGGCG  | 6660 |

AAAAACCGTC TATCAGGGCG ATGGCCCACT ACGTGAACCA TCACCCTAAT CAAGTTTTTTT 6720  
 GGGGTCGAGG TGCCGTAAAG CACTAAATCG GAACCCTAAA GGGAGCCCCC GATTTAGAGC 6780  
 TTGACGGGGA AAGCCGGCGA ACGTGGCGAG AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG 6840  
 CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG TAGCGGTCAC GCTGCGCGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT 6900  
 TAATGCGCCG CTACAGGGCG CGTCAG 6926

## 70. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 49 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## 10 (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

selP promoter

## 15 (xi) Szekvencia leírása:

TATGAGATCT AAAAATTGAA ATTTTATTTT TTTTTTTTGG AATATAAAT

49

## 71. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 34 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

oFIX.1

## (xi) Szekvencia leírása:

TCATGTTTAC GCGCTCCATG GCCGCGGCCG CACC

34

## 72. azonosítási számú szekvencia

## (i) Szekvencia jellemzői:

- (A) hosszúság: 5532 bázispár  
 (B) típus: nukleinsav  
 (C) szál típusa: egyes  
 (D) topológia: lineáris

## (ii) Molekula típusa:

## (A) Megnevezés:

egyéb nukleinsav  
 szintetikus DNS-oligonukleotid

## (vii) Közvetlen forrás:

## (B) klón:

pN2gpta-FIX

## (xi) Szekvencia leírása:

GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTTC TAAATACATT 60  
 CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA 120  
 GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT 180  
 GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT 240  
 TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT 300  
 TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG 360  
 TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA 420  
 ATGACTTGGT TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA 480  
 GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTACTTCTGA 540  
 CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA 600  
 CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA 660  
 CCACGATGCC TG TAGCAATG GCAACAACGT TCGCAAACCT ATTAAGTGGC GAACTACTTA 720  
 CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC 780  
 TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC 840  
 GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG 900

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA  | 960  |
| TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT | 1020 |
| AGATTGATTT AAAACTTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA | 1080 |
| ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG  | 1140 |
| AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA  | 1200 |
| CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT  | 1260 |
| TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC   | 1320 |
| CGTAGTTAGG CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACC GCC TACATACCTC GCTCTGCTAA | 1380 |
| TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA  | 1440 |
| GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCTG TGCACACAGC | 1500 |
| CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA  | 1560 |
| GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA  | 1620 |
| CAGGAGAGCG CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCTG | 1680 |
| GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC  | 1740 |
| TATGGAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG   | 1800 |
| CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG  | 1860 |
| AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG  | 1920 |
| AAGCGGAAGA GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC GCGTTGGCCG ATTCATTAAT  | 1980 |
| GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATG  | 2040 |
| TGAGTTAGCT CACTCATTAG GCACCCCGAG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATGT  | 2100 |
| TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTT ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG  | 2160 |
| CCAAGCGCGC AATTAACCCT CACTAAAGGG AACAAAAGCT GGAGCTCCAC CGCGGTGGCG  | 2220 |
| GCCGCTTGTT AATTTTCAAT TCCAATGAAT TAACCTTGGA AATCCATCTT TCATTAAGTG  | 2280 |
| AGCTTTGTTT TTTCTTAAT CCAGTTGACA TACCGGGATA CCTTGGTATA TATTCCATAT   | 2340 |
| TTGCCTTTCA TTGCACACTC TTCACCCCGAG CTAATAATTC CAGTTAAGAA ACTGGTCCCT | 2400 |
| TCCACTTCAG TAACATGGGG TCCCCACTA TCTCCTTGAC ATGAATCTCT ACCTCCTTCA   | 2460 |
| TGGAAGCCAG CACAGAACAT GTTGTTATAG ATGGTGAAC TGTAGATCG AAGACATGTG    | 2520 |
| GCTCGGTCAA CAAGTGGAAC TCTAAGGTAC TGAAGAACTA AAGCTGATCT CCCTTTGTGG  | 2580 |
| AAGACTCTTC CCCAGCCACT TACATAGCCA GATCCAAATT TGAGGAAGAT GTTCGTGTAT  | 2640 |
| TCCTTGTCAG CAATGCAAAT AGGTGTAACG TAGCTGTTTA GCACTAAGGG TTCGTCCAGT  | 2700 |
| TCCAGAAGGG CAATGTCATG GTTGTACTTA TTAATAGCTG CATTGTAGTT GTGGTGAGGA  | 2760 |
| ATAATTCGAA TCACATTTCTG CTTTGTCTCT GTATGTTCTG TCTCCTCAAT ATTATGTTCA | 2820 |
| CCTGCGACAA CTGTAATTTT AACACCAGTT TCAACACAGT GGGCAGCAGT TACAATCCAT  | 2880 |
| TTTTCATTA CGATAGAGCC TCCACAGAAT GCATCAACTT TACCATTCAA AACAACTGC    | 2940 |

|            |             |            |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| CAAGGGAATT | GACCTGGTTT  | GGCATCTTCT | CCACCAACAA | CCCGAGTGAA | GTCATTAAAT | 3000 |
| GATTGGGTGC | TTTGAGTGAT  | GTTATCCAAA | ATGGTTTCAG | CTTCAGTAGA | ATTTACATAG | 3060 |
| TCCACATCAG | GAAAAACAGT  | CTCAGCACGG | GTGAGCTTAG | AAGTTTGTGA | AACAGAAACT | 3120 |
| CTTCCACATG | GAAATGGCAC  | TGCTGGTTCA | CAGGACTTCT | GGTTTTCTGC | AAGTCGATAT | 3180 |
| CCCTCAGTAC | AGGAGCAAAC  | CACCTTGTTA | TCAGCACTAT | TTTTACAAAA | CTGCTCGCAT | 3240 |
| CTGCCATTCT | TAATGTTACA  | TGTTACATCT | AATTCACAGT | TCTTTCCTTC | AAATCCAAAG | 3300 |
| GGACACCAAC | ATTCATAGGA  | ATTAATGTCA | TCCTTGCAAC | TGCCGCCATT | TAAACATGGA | 3360 |
| TTGGACTCAC | ACTGATCTCC  | ATCAACATAC | TGCTTCCAAA | ATTCAGTTGT | TCTTTCAGTG | 3420 |
| TTTTCAAAAA | CTTCTCGTGC  | TTCTTCAAAA | CTACACTTTT | CTTCCATACA | TTCTCTCTCA | 3480 |
| AGGTTCCCTT | GAACAAACTC  | TTCCAATTTA | CCTGAATTAT | ACCTCTTTGG | CCGATTCAGA | 3540 |
| ATTTTGTGG  | CGTTTTCATG  | ATCAAGAAAA | ACTGTACATT | CAGCACTGAG | TAGATATCCT | 3600 |
| AAAAGGCAGA | TGGTGATGAG  | GCCTGGTGAT | TCTGCCATGA | TCATGTTTAC | GCGCTCCATG | 3660 |
| GAGGCCTTAT | TTATATTCCA  | AAAAAAAAAA | ATAAAATTTT | AATTTTTAGA | TCCCCCAACT | 3720 |
| TAAGGGTACC | GCCTCGACAT  | CTATATACTA | TATAGTAATA | CCAATACTCA | AGACTACGAA | 3780 |
| ACTGATACAA | TCTCTTATCA  | TGTGGGTAAT | GTTCTCGATG | TCGAATAGCC | ATATGCCGGT | 3840 |
| AGTTGCGATA | TACATAAACT  | GATCACTAAT | TCCAAACCCA | CCCGCTTTTT | ATAGTAAGTT | 3900 |
| TTTCACCCAT | AAATAATAAA  | TACAATAATT | AATTTCTCGT | AAAAGTAGAA | AATATATTCT | 3960 |
| AATTTATTGC | ACGGTAAGGA  | AGTAGAATCA | TAAAGAACAG | TGACGGATGA | TCCCCAAGCT | 4020 |
| TGGACACAAG | ACAGGCTTGC  | GAGATATGTT | TGAGAATACC | ACTTTATCCC | GCGTCAGGGA | 4080 |
| GAGGCAGTGC | GTA AAAAGAC | GCGGACTCAT | GTGAAATACT | GGTTTTTAGT | GCGCCAGATC | 4140 |
| TCTATAATCT | CGCGCAACCT  | ATTTTCCCCT | CGAACACTTT | TTAAGCCGTA | GATAAACAGG | 4200 |
| CTGGGACACT | TCACATGAGC  | GAAAAATACA | TCGTCACCTG | GGACATGTTG | CAGATCCATG | 4260 |
| CACGTAAACT | CGCAAGCCGA  | CTGATGCCTT | CTGAACAATG | GAAAGGCATT | ATTGCCGTAA | 4320 |
| GCCGTGGCGG | TCTGGTACCG  | GGTGCGTTAC | TGGCGCGTGA | ACTGGGTATT | CGTCATGTCT | 4380 |
| ATACCGTTTG | TATTTCCAGC  | TACGATCAGC | ACAACCAGCG | CGAGCTTAAA | GTGCTGAAAC | 4440 |
| GCGCAGAAAG | CGATGGCGAA  | GGCTTCATCG | TTATTGATGA | CCTGGTGGAT | ACCGGTGGTA | 4500 |
| CTGCGGTGTC | GATTTCGTGAA | ATGTATCCAA | AAGCGCACTT | TGTCACCATC | TTCGCAAAAC | 4560 |
| CGGCTGGTCG | TCCGCTGGTT  | GATGACTATG | TTGTTGATAT | CCCGCAAGAT | ACCTGGATTG | 4620 |
| AACAGCCGTG | GGATATGGGC  | GTCGTATTCT | TCCCGCCAAT | CTCCGGTCGC | TAATCTTTTC | 4680 |
| AACGCCTGGC | ACTGCCGGGC  | GTTGTTCTTT | TTAACTTCAG | GCGGGTTACA | ATAGTTTCCA | 4740 |
| GTAAGTATTC | TGGAGGCTGC  | ATCCATGACA | CAGGCAAACC | TGAGCGAAAC | CCTGTTCAAA | 4800 |
| CCCCGCTTTG | GGCTGCAGGA  | ATTCGATATC | AAGCTTATCG | ATACCGTCGC | GGCCGCGACC | 4860 |
| TCGAGGGGGG | GCCCGGTACC  | CAATTCGCCC | TATAGTGAGT | CGTATTACGC | GCGCTCACTG | 4920 |
| GCCGTCTGTT | TACAACGTCT  | TGACTGGGAA | AACCCTGGCG | TTACCCAAC  | TAATCGCCTT | 4980 |

GCAGCACATC CCCCTTTCGC CAGCTGGCGT AATAGCGAAG AGGCCCCGAC CGATCGCCCT 5040  
 TCCCAACAGT TCGCAGCCT GAATGGCGAA TGGAAATTGT AAGCGTTAAT ATTTTGTAA 5100  
 AATTCGCGTT AAATTTTTGT TAAATCAGCT CATTTTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA 5160  
 AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGTGT CCAGTTTGGA 5220  
 ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC 5280  
 AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC CCTAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC 5340  
 GTAAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC 5400  
 CGGCGAACGT GGCGAGAAAAG GAAGGGAAGA AAGCGAAAGG AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG 5460  
 CAAGTGTAGC GGTCACGCTG CGCGTAACCA CCACACCCGC CGCGCTTAAT GCGCCGCTAC 5520  
 AGGGCGCGTC AG 5532

## 73. azonosítási számú szekvencia

- |                           |                                |                          |                                |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| (i) Szekvencia jellemzői: | 20                             | (vii) Közvetlen forrás:  |                                |
| (A) hosszúság:            | 14 bázispár                    | (B) klón:                | vad típusú gp160 <sub>MN</sub> |
| (B) típus:                | nukleinsav                     | (ix) Jellemző:           |                                |
| (C) szál típusa:          | kettős                         | (A) név/kulcsszó:        | CDS                            |
| (D) topológia:            | lineáris                       | (B) lokáció:             | 3...14                         |
| (ii) Molekula típusa:     | egyéb nukleinsav               | (xi) Szekvencia leírása: |                                |
| (A) Megnevezés:           | szintetikus DNS-oligonukleotid |                          |                                |
|                           | 25                             |                          |                                |

CA ATG AGA GTG AAG

Met Arg Val Lys

1

14

## 74. azonosítási számú szekvencia

- |                           |            |                          |          |
|---------------------------|------------|--------------------------|----------|
| (i) Szekvencia jellemzői: |            | (D) topológia:           | lineáris |
| (A) hosszúság:            | 4 aminosav | (ii) Molekula típusa:    | protein  |
| (B) típus:                | aminosav   | (xi) Szekvencia leírása: |          |
|                           | 35         |                          |          |

Met Arg Val Lys

1

## 75. azonosítási számú szekvencia

- |                           |                                |                          |                            |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| (i) Szekvencia jellemzői: | 40                             | (vii) Közvetlen forrás:  |                            |
| (A) hosszúság:            | 14 bázispár                    | (B) klón:                | gp160 vselP-gp160 vírusban |
| (B) típus:                | nukleinsav                     | (ix) Jellemző:           |                            |
| (C) szál típusa:          | kettős                         | (A) név/kulcsszó:        | CDS                        |
| (D) topológia:            | lineáris                       | (B) lokáció:             | 3...14                     |
| (ii) Molekula típusa:     | egyéb nukleinsav               | (xi) Szekvencia leírása: |                            |
| (A) Megnevezés:           | szintetikus DNS-oligonukleotid |                          |                            |
|                           | 45                             |                          |                            |

CC ATG GCC GTG AAG

Met Ala Val Lys

1

14

## 76. azonosítási számú szekvencia

- |                           |            |                          |          |
|---------------------------|------------|--------------------------|----------|
| (i) Szekvencia jellemzői: |            | (D) topológia:           | lineáris |
| (A) hosszúság:            | 4 aminosav | (ii) Molekula típusa:    | protein  |
| (B) típus:                | aminosav   | (xi) Szekvencia leírása: |          |

Met Ala Val Lys

1

## 77. azonosítási számú szekvencia

- |                           |             |                  |            |
|---------------------------|-------------|------------------|------------|
| (i) Szekvencia jellemzői: |             | (B) típus:       | nukleinsav |
| (A) hosszúság:            | 18 bázispár | (C) szál típusa: | kettős     |
|                           | 60          | (D) topológia:   | lineáris   |

- (ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid

- (vii) Közvetlen forrás:  
(B) klón: vad típusú-S protein

**GAA ATG AGG GTC CTG GGT**  
**Met Arg Val Leu Gly**  
**1 5**

78. azonosítási számú szekvencia

- (i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 5 aminosav  
(B) típus: aminosav

**Met Arg Val Leu Gly**  
**1 5**

79. azonosítási számú szekvencia

- (i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 18 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: kettős  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid

**GCC ATG GCG GTC CTG GGT**  
**Met Ala Val Leu Gly**  
**1 5**

80. azonosítási számú szekvencia

- (i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 5 aminosav  
(B) típus: aminosav

**Met Ala Val Leu Gly**  
**1 5**

81. azonosítási számú szekvencia

- (i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 17 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: kettős  
(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid

**TT ATG CAG CGC GTG AAC**  
**Met Gln Arg Val Asn**  
**1 5**

82. azonosítási számú szekvencia

- (i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 5 aminosav  
(B) típus: aminosav

**Met Gln Arg Val Asn**  
**1 5**

83. azonosítási számú szekvencia

- (i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 17 bázispár  
(B) típus: nukleinsav  
(C) szál típusa: kettős

- (ix) Jellemző:  
(A) név/kulcsszó: CDS  
(B) lokáció: 4...18

- (xi) Szekvencia leírása:

5

18

- 10 (D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: protein  
(xi) Szekvencia leírása:

- (vii) Közvetlen forrás:

- (B) klón: S-protein a kimérákban

- (ix) Jellemző:

- 20 (A) név/kulcsszó: CDS  
(B) lokáció: 4...18

- (xi) Szekvencia leírása:

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 79:

25

18

- 30 (D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: protein  
(xi) Szekvencia leírása:

- (vii) Közvetlen forrás:

- (B) klón: vad típusú IX faktor

- (ix) Jellemző:

- 40 (A) név/kulcsszó: CDS  
(B) lokáció: 3...17

- (xi) Szekvencia leírása:

17

- (D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: protein  
(xi) Szekvencia leírása:

50

- 55 (D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: egyéb nukleinsav  
(A) Megnevezés: szintetikus DNS-oligonukleotid  
(vii) Közvetlen forrás:

(B) klón: IX faktor vFIXS  
(ix) Jellemző:  
(A) név/kulcsszó: CDS

CC ATG GAG CGC GTG AAC  
Met Glu Arg Val Asn  
1 5

84. azonosítási számú szekvencia

(i) Szekvencia jellemzői:  
(A) hosszúság: 5 aminosav  
(B) típus: aminosav

Met Glu Arg Val Asn  
1 5

(B) lokáció: 3...17  
(xi) Szekvencia leírása:

17

(D) topológia: lineáris  
(ii) Molekula típusa: protein  
10 (xi) Szekvencia leírása:

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás módosított eukarióta citoplazmatikus DNS-vírus előállítására módosított virális genom közvetlen molekuláris klónozásával, *azzal jellemezve*, hogy

i) chordopoxvírus genomját tartalmazó tisztított DNS-molekula extracelluláris körülmények közötti módosításával előállítunk egy, a módosított vírusgenomot tartalmazó módosított DNS-molekulát;

ii) a módosított DNS-molekulát egy gazdasejtbe juttatjuk be, amely a módosított vírusgenomot fertőző virionokba pakolja; és

iii) a gazdasejtből kinyerjük a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionokat.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-molekula extracelluláris körülmények közötti módosításának lépésében a DNS-molekulát egy szekvenciaspecifikus endonukleázzal hasítjuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-molekula módosításának lépésében a chordopoxvírus-genomba egy DNS-szekvenciát inzertálunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-szekvenciát a genomba egy szekvenciaspecifikus endonukleáz valamely hasítási helyén inzertáljuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyeként a genomban egy egyetlen ilyen helyként előforduló helyre inzertáljuk a DNS-szekvenciát.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy genomként vacciniavírus-genomba inzertáljuk a DNS-szekvenciát, és egyedi hasítóhelyként NotI-, SmaI-, ApaI- vagy RsrII-helyet alkalmazunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vakciniavírus-genomként a 4.1A ábrán bemutatott vdTK-vacciniavírusba inzertáljuk a DNS-szekvenciát.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy genomként egy, chordopoxvírus-genomból természetes körülmények között hiányzó, egyedi hasítási helyre inzertált, további DNS-szekvenciát is tartalmazó genomot alkalmazunk.

9. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy genomként egy Escherichia coli  $\beta$ -galaktozidáz génszekvenciát tartalmazó szárnyas-

poxvírus-genomot, és az egyetlen hasítási helyként NotI bakteriális restrikciós endonukleáz hasítási helyet alkalmazunk.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-szekvenciát a genomba egy első szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helye és egy második szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helye közé inzertáljuk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a genomban az első és a második hasítási helyként egyaránt egyedi helyet alkalmazunk.

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a genomba inzertált DNS-szekvenciaként legalább egy részében egy promoter transzkripció szabályozása alatt álló DNS-szekvenciát alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként a genomba inzertált DNS-szekvenciában elhelyezkedő promotert alkalmazunk.

14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként a módosított vírusgenomban az inzertált DNS-szekvencia előtt 5'-irányban elhelyezkedő promotert alkalmazunk.

15. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként a módosított vírusgenom által kódolt RNS-polimeráz által hasznosított promotert alkalmazunk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként a chordopoxvírus egy RNS-polimeráza általi transzkripció iniciálására alkalmas promotert alkalmazunk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként a chordopoxvírus egy természetben előforduló promoterének módosított formáját alkalmazunk.

18. Az 1–17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-molekula módosításának lépése során egy DNS-szekvenciát deletálunk genomból.

19. Az 1–17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-molekula módosításának lépése során egy DNS-szekvenciát szubsztituálunk genomban.

20. A 1–19. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy további lépésként a gazdasej-

tet egy további chordopoxvírussal is fertőzzük, amely egy további genomot tartalmaz, amely expresszáldva a módosított virális genomot fertőző virionokba pakolja.

21. Az 1–20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a módosított DNS-molekula bejuttatását a gazdasejtbe a gazdasejt további chordopoxvírussal való fertőzése után mintegy egy órával hajtjuk végre.

22. Az 1–21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a további genomnak a gazdasejtben való expressziójával nem állítunk elő olyan fertőző virionokat, amelyek a további genomot tartalmazzák.

23. Az 1–21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a módosított virális genomként egy módosított vacciniavírus-genomot, további genomként egy szárnyaspoxvirus-genomot és gazdasejtként egy emlőssejtet alkalmazunk.

24. Az 1–23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionok visszanyerésének lépésében egy további gazdasejtet fertőzünk a gazdasejtben olyan körülmények között keletkezett fertőző virionokkal, hogy a további genom expressziója a gazdasejtben nem eredményez olyan fertőző virionokat, amelyek a további genomot tartalmazzák.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított virális genomként egy módosított vacciniavírus-genomot, további genomként egy szárnyaspoxvirus-genomot és további gazdasejtként egy emlőssejtet alkalmazunk.

26. Az 1–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított virális genomként szelektív markergént tartalmazó virális genomot és további genomként a szelektív markergént nem tartalmazó genomot alkalmazunk, és a gazdasejt fertőzésének lépését egy, a szelektív markergént expresszáldó genomra szelektív körülmények között végezzük.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szelektív markergénnek a gazdasejtben való expressziója útján a gazdasejtet rezisztenssé tesszük egy, a gazdasejt fertőzése során a szelektív markergént expresszáldó genom szelektálásához elegendően magas koncentrációban jelen lévő citotoxikus droggal szemben.

28. Módosított chordopoxvírus, *azzal jellemezve*, hogy chordopoxvírus-genom közvetlen molekuláris klónozása útján az alábbi lépések végrehajtásával állítható elő:

(I) extracelluláris körülmények között egy, chordopoxvírus-genomot tartalmazó, tisztított DNS-molekula módosítása az alábbi lépésekkel:

a) a DNS-molekula egy szekvenciaspecifikus endonukleáz egyedi hasítási helyén történő elhasítása, és természetes körülmények között a genomban elő nem forduló DNS-szekvencia inzertálása a hasítási helyre, vagy

b) a DNS-molekulát egy első, egyedi szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyen és egy második, egyedi szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyen való elhasítása, és természetes körülmények kö-

zött a genomban elő nem forduló DNS-szekvencia inzertálása a hasítási helyek közé,

ezáltal a módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekula előállítás;

5 (II) a módosított DNS-molekulának gazdasejtbe való bejuttatása és ezáltal a módosított virális genom fertőző virionokká történő pakolása; és

(III) a módosított virális genomot tartalmazó fertőző virionoknak a gazdasejtből történő visszanyerése.

10 29. A 28. igénypont szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a chordopoxvírus-genomban természetes körülmények között elő nem forduló DNS-szekvencia többszörös klónozóhely.

15 30. A 28. igénypont szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a chordopoxvírus-genomban természetes körülmények között elő nem forduló DNS-szekvencia polipeptidet kódoló DNS.

20 31. A 28–30. igénypontok bármelyike szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a chordopoxvírus-genom egy vacciniavírus-genom és az egyedi hasítási hely a NotI, SmaI, ApaI vagy RsrII bakteriális endonukleázok bármelyikének hasítási helye.

25 32. A 28–31. igénypontok bármelyike szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a chordopoxvírus-genom egy, chordopoxvírus-genomban természetes körülmények között elő nem forduló további DNS-szekvenciát tartalmaz, amely az egyedi restrikciós helyre van inzertálva.

30 33. A 28–30. igénypontok bármelyike szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a chordopoxvírus-genom egy szárnyaspoxvirus-genom, amely további DNS-szekvenciaként az *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz-gén DNS-szekvenciáját tartalmazza és az egyedi hasítási hely a bakteriális NotI restrikciós endonukleáz hasítási helye.

35 34. A 28–33. igénypontok bármelyike szerinti, módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a chordopoxvírus-genomban természetes körülmények között elő nem forduló, az egyedi hasítási helyre inzertált DNS-szekvencia legalább egy része egy promoter transzkripció irányítása alatt áll.

40 35. A 34. igénypont szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a promoter a genomba inzertált DNS-szekvenciában helyezkedik el.

45 36. A 34. igénypont szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a promoter a módosított virális genomban a genomba inzertált DNS-szekvenciától 5'-irányban helyezkedik el.

50 37. A 34. igénypont szerinti módosított vírus, *azzal jellemezve*, hogy a genom chordopoxvírus-genom és a promoter a természetes körülmények között előforduló chordopoxvírus promoter egy változata.

55 38. Módosított chordopoxvírus-genomot tartalmazó DNS-molekula, *azzal jellemezve*, hogy chordopoxvírus-genom tisztított DNS-molekulájának extracelluláris körülmények között végzett módosítása útján végrehajtott közvetlen molekuláris klónozással előállítható az alábbi lépések végrehajtásával.

60 a) a DNS-molekula egy szekvenciaspecifikus endonukleáz egyedi hasítási helyén történő elhasítása, és egy,

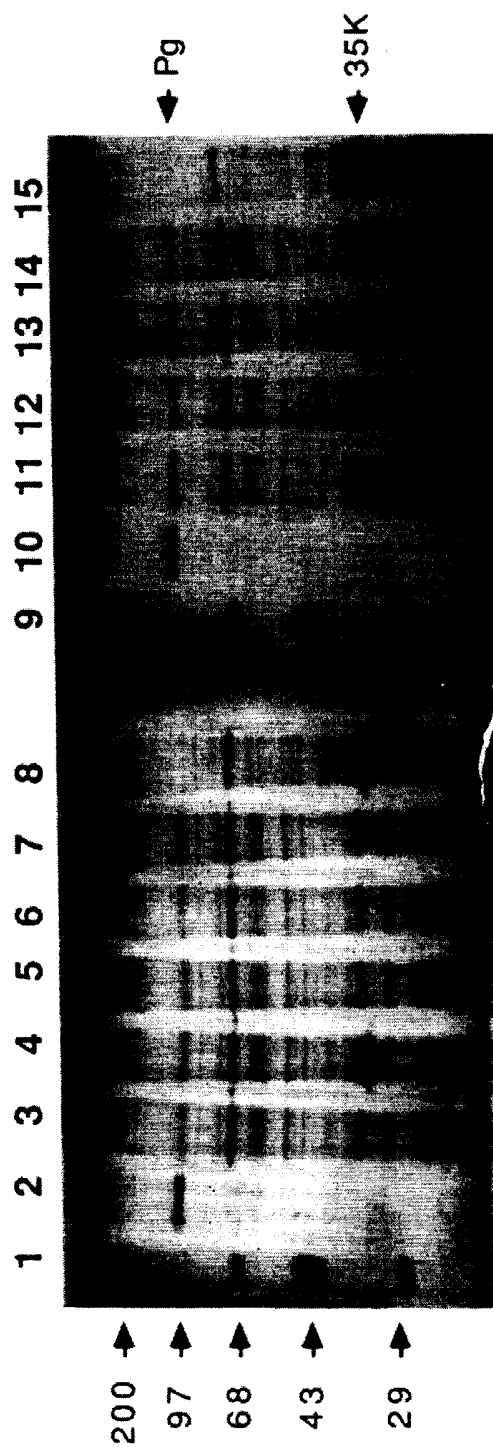
természetes körülmények között a genomban elő nem forduló DNS-szekvencia inzertálása a hasítási helyre, vagy

b) a DNS-molekulát egy első, egyedi szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyen és egy második, egyedi szekvenciaspecifikus endonukleáz hasítási helyen való elhasítása, és egy, természetes körülmények között a genomban elő nem forduló DNS-szekvencia inzertálása a hasítási helyek közé,

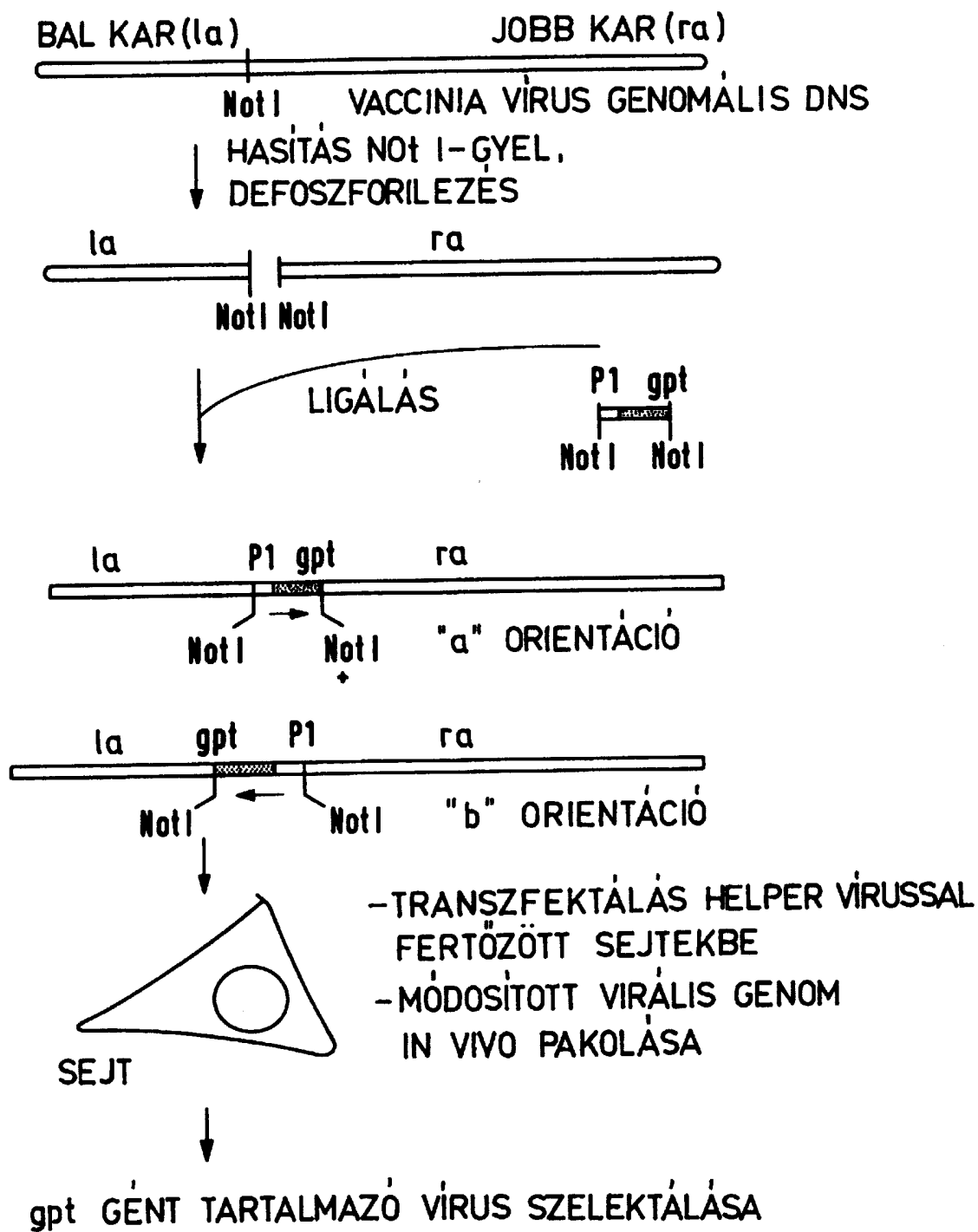
ezáltal egy, a módosított virális genomot tartalmazó módosított DNS-molekula előállítására.

39. Eljárás gazdasejtből rekombináns fehérje előállítására módosított vírus alkalmazásával, *azzal jellemezve*, hogy a 28–37. igénypontok bármelyike szerinti, módosított vírus felhasználásával, megfelelő gazdasejtben, önmagában ismert módon rekombináns fehérjét expresszáltatunk, és adott esetben a fehérjét elkülönítjük.

# 1.1 ábra

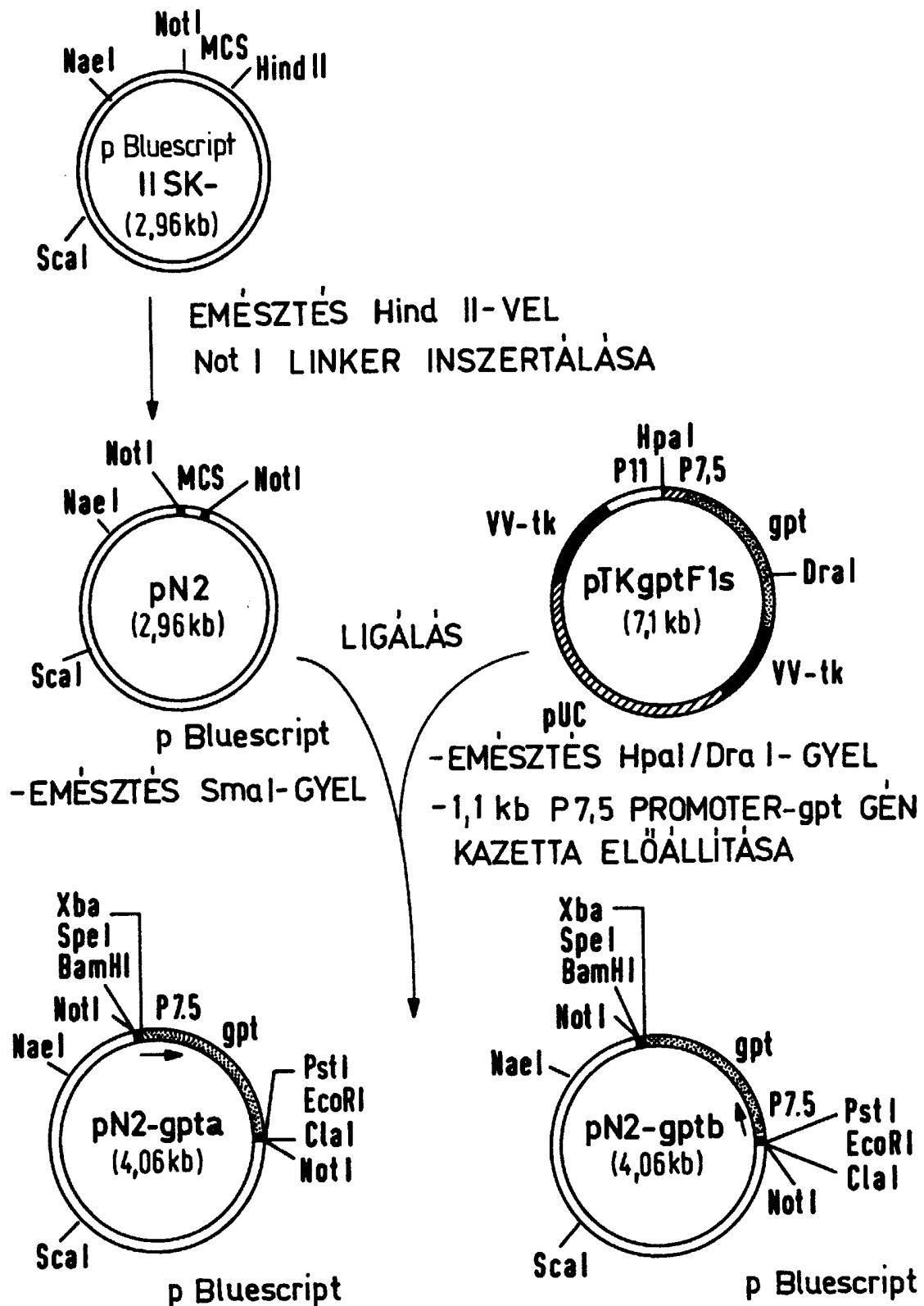


1.2 ábra

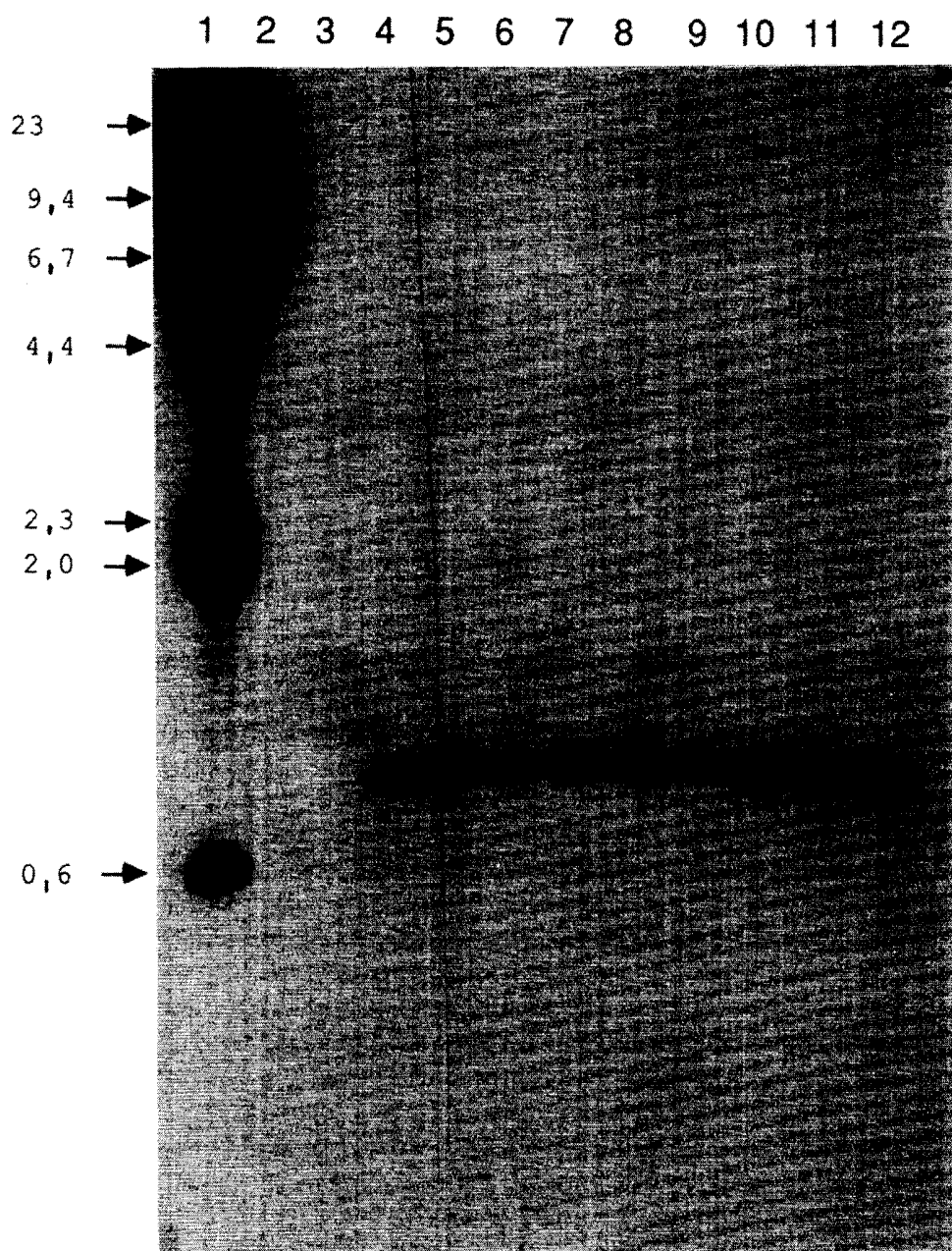


### 1.3 ábra

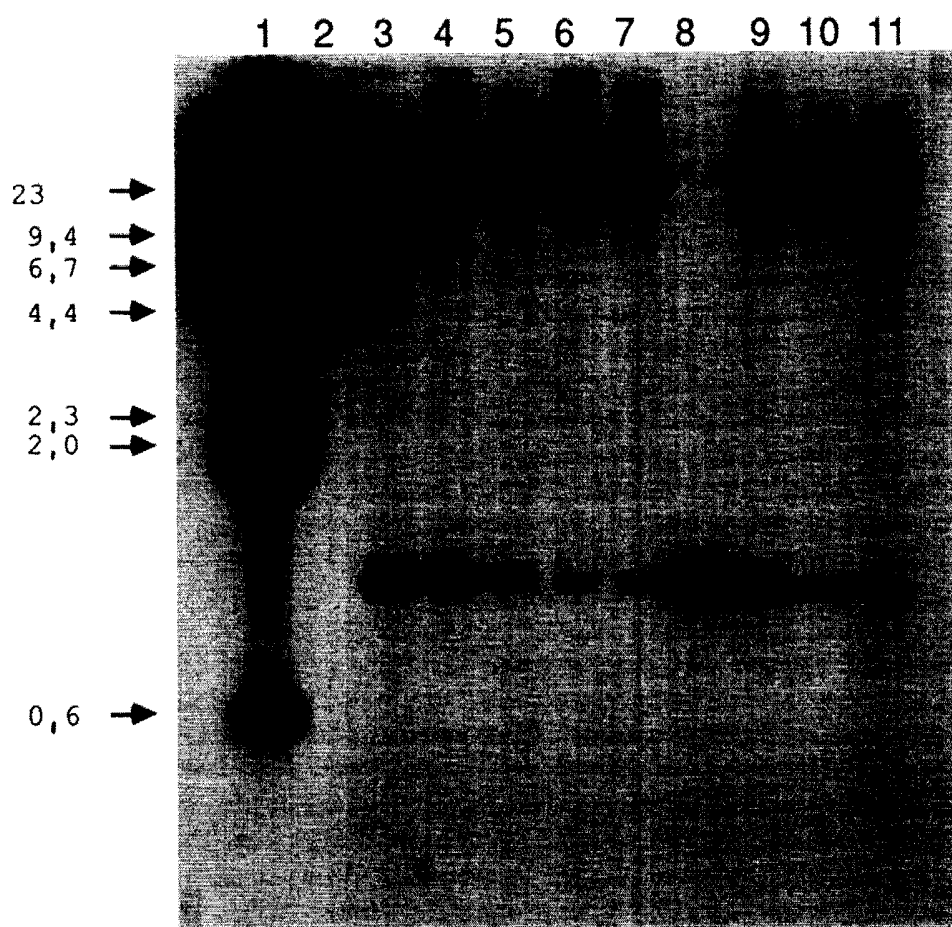
## pN2-gpta ÉS pN2-gptb PLAZMIDOK SZERKESZTÉSE



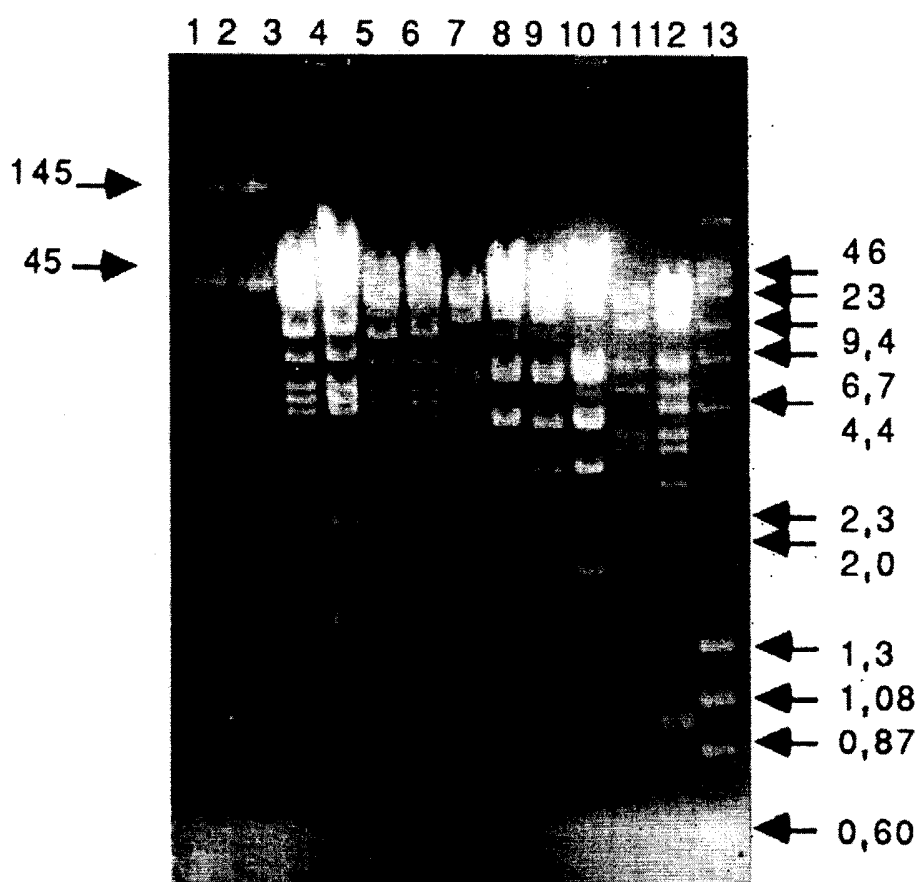
## 1.4 ábra



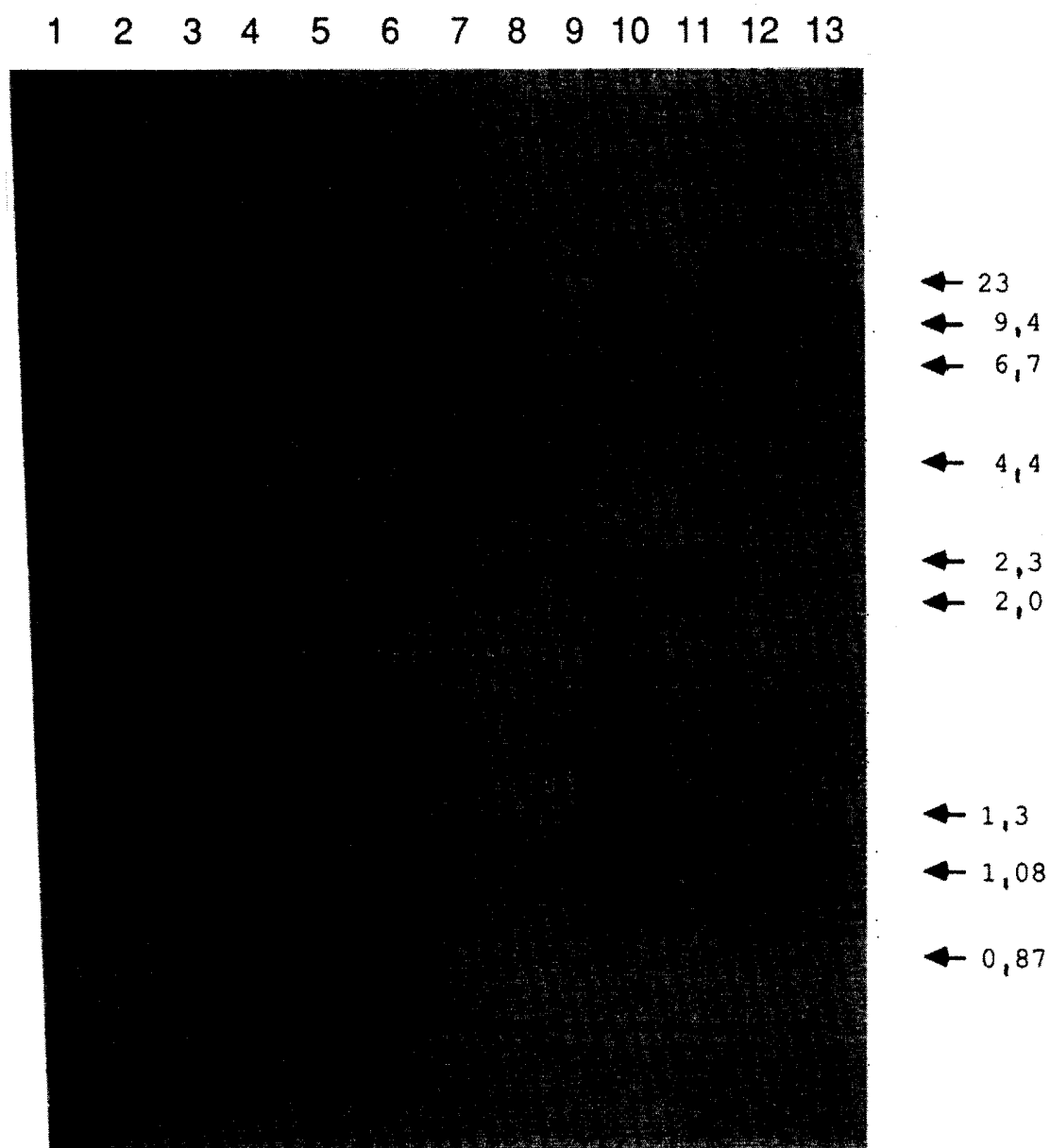
## 1.5 ábra



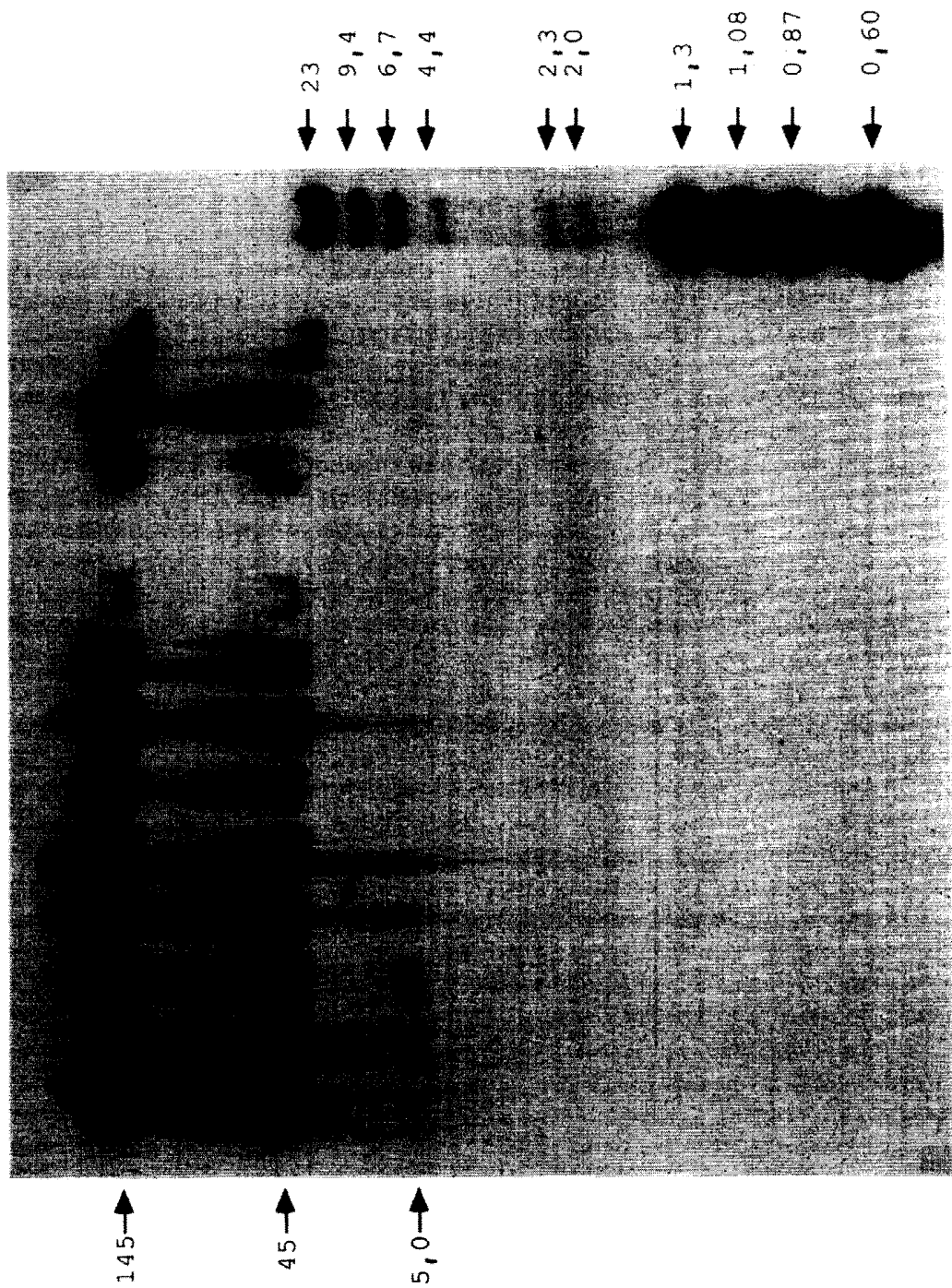
## 1.6 ábra

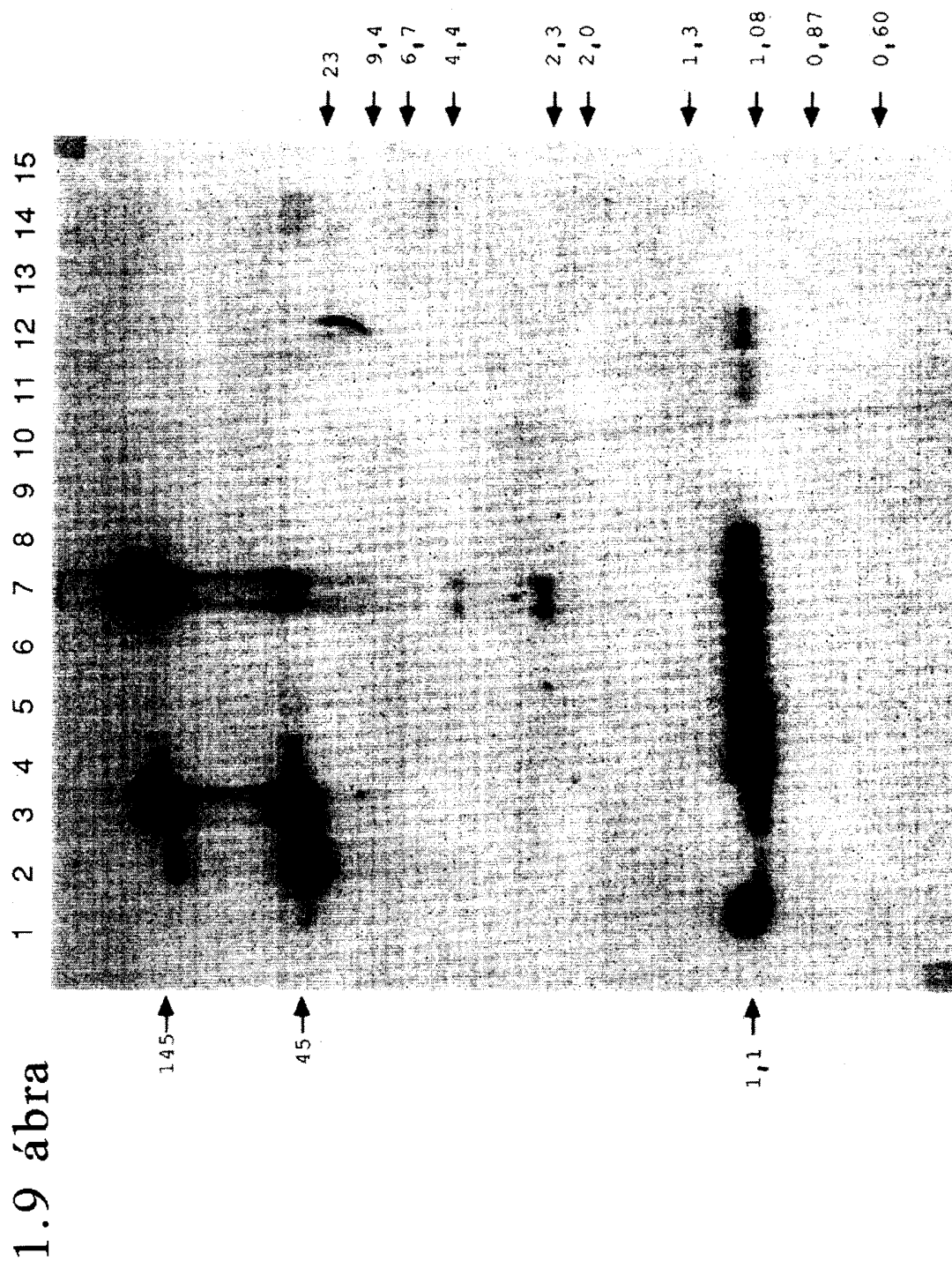


## 1.7 ábra

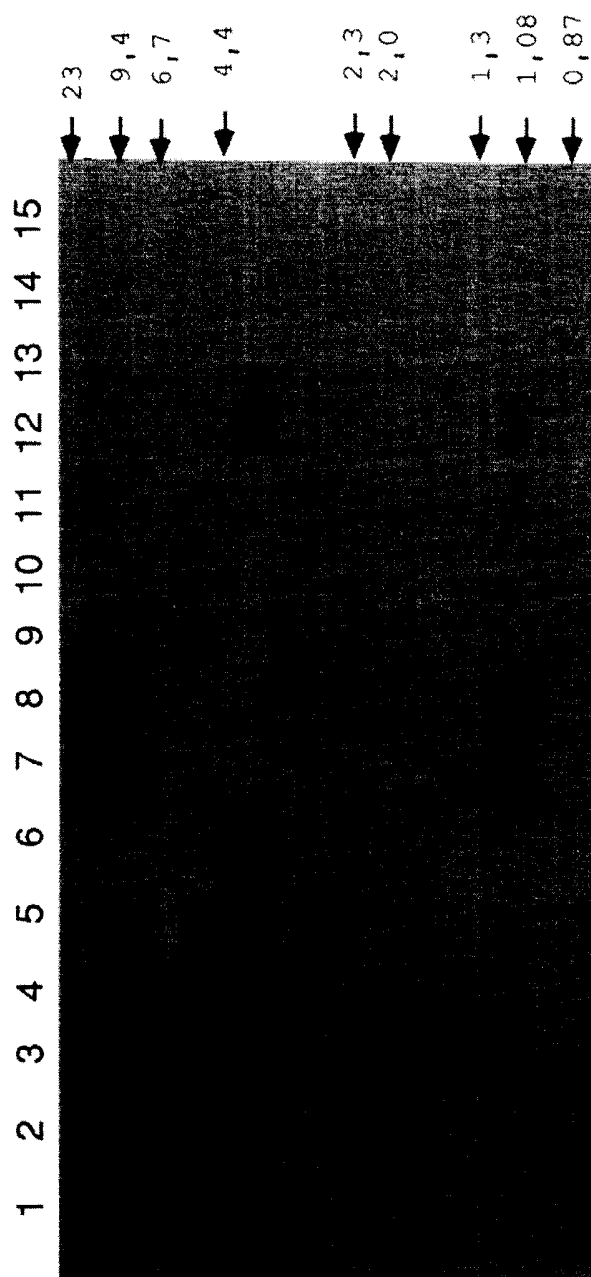


1.8 ábra 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

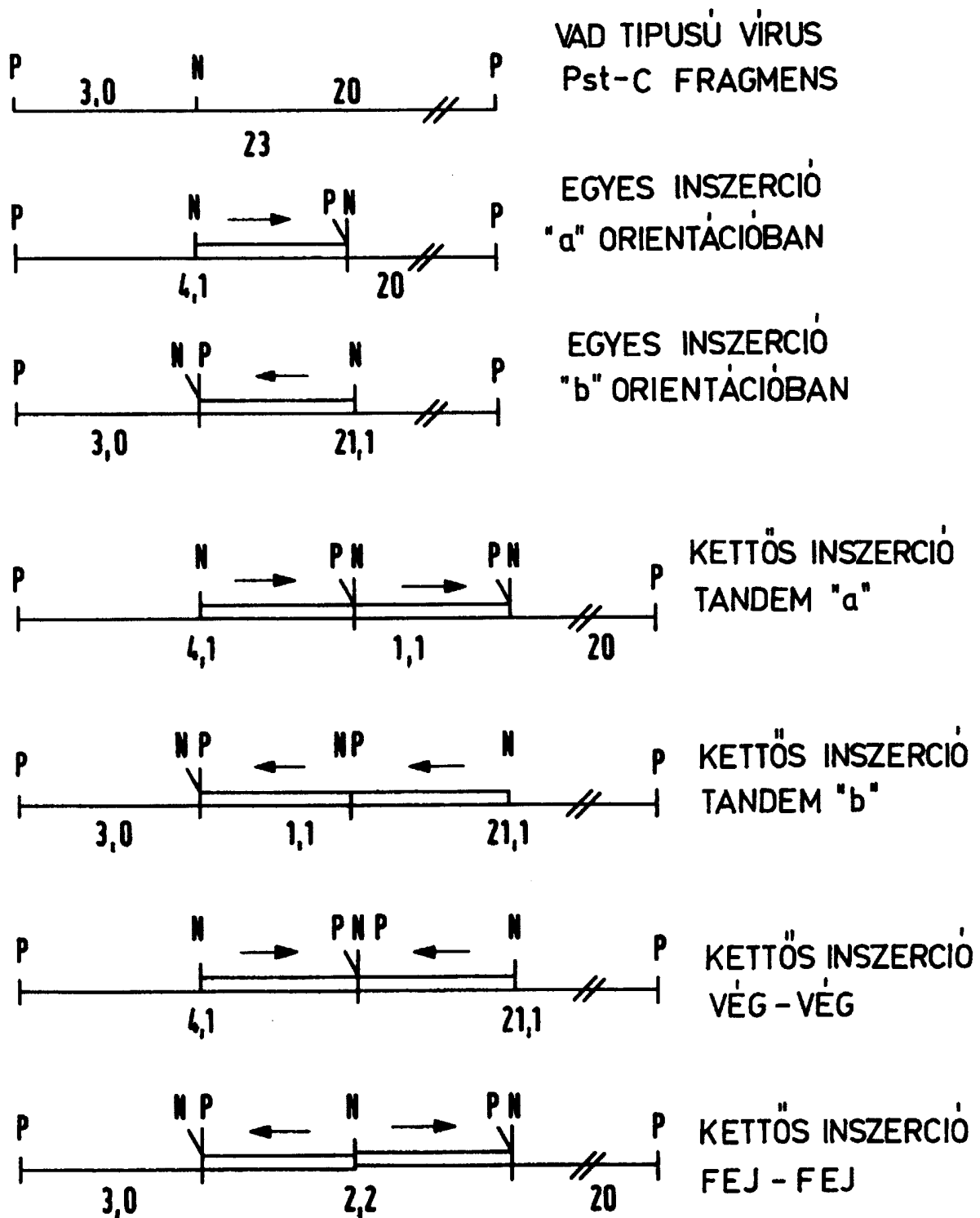




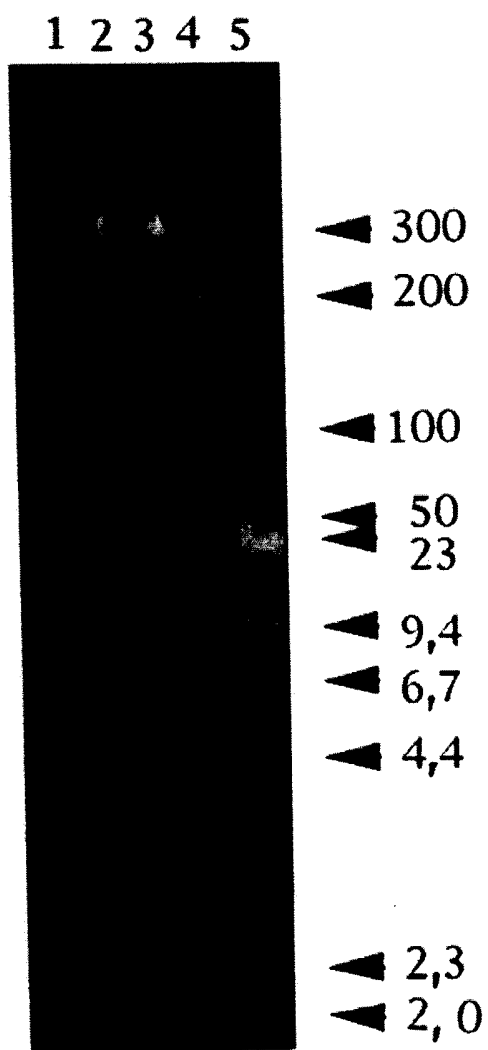
## 1.10 ábra



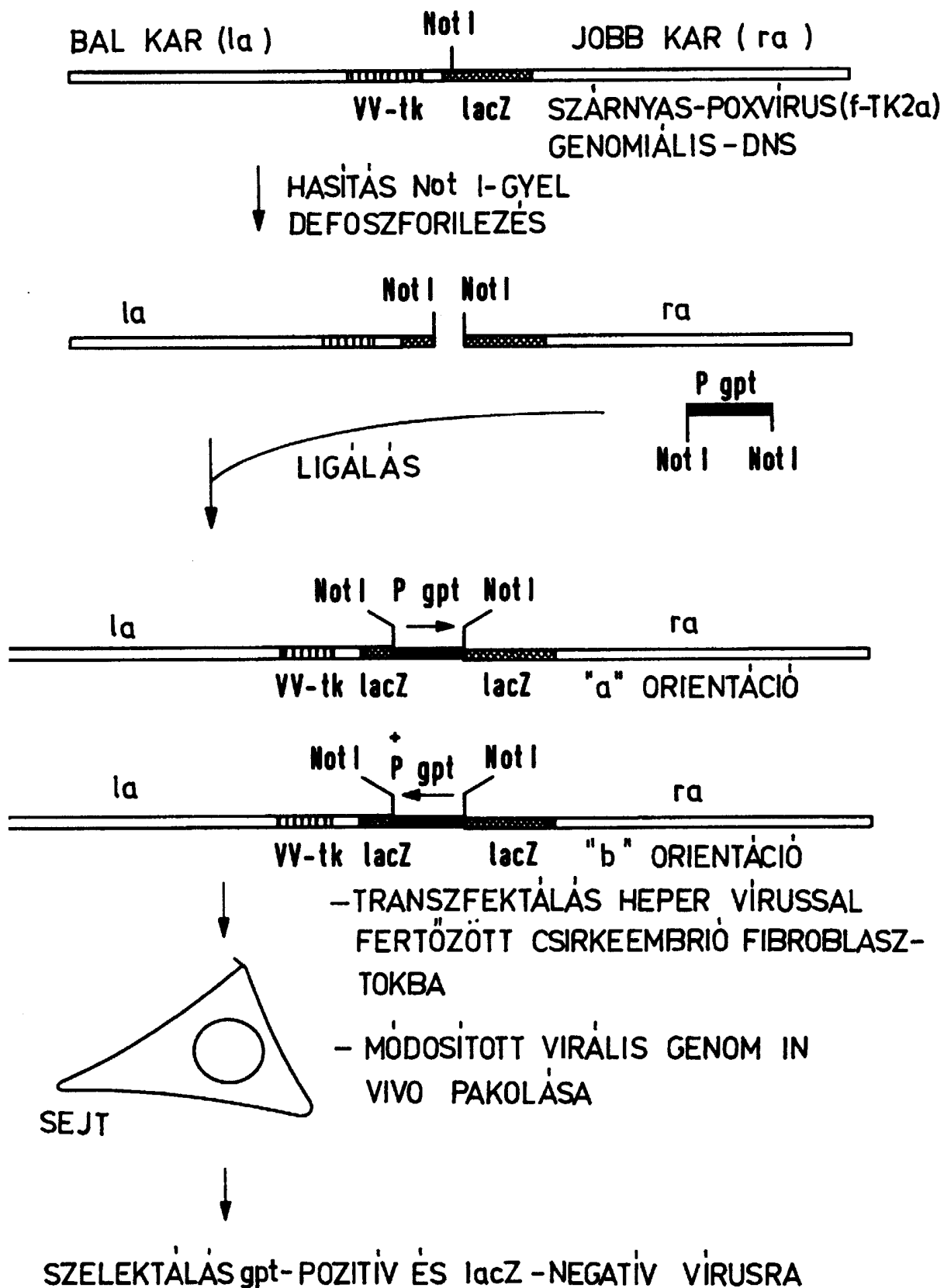
1.11 ábra



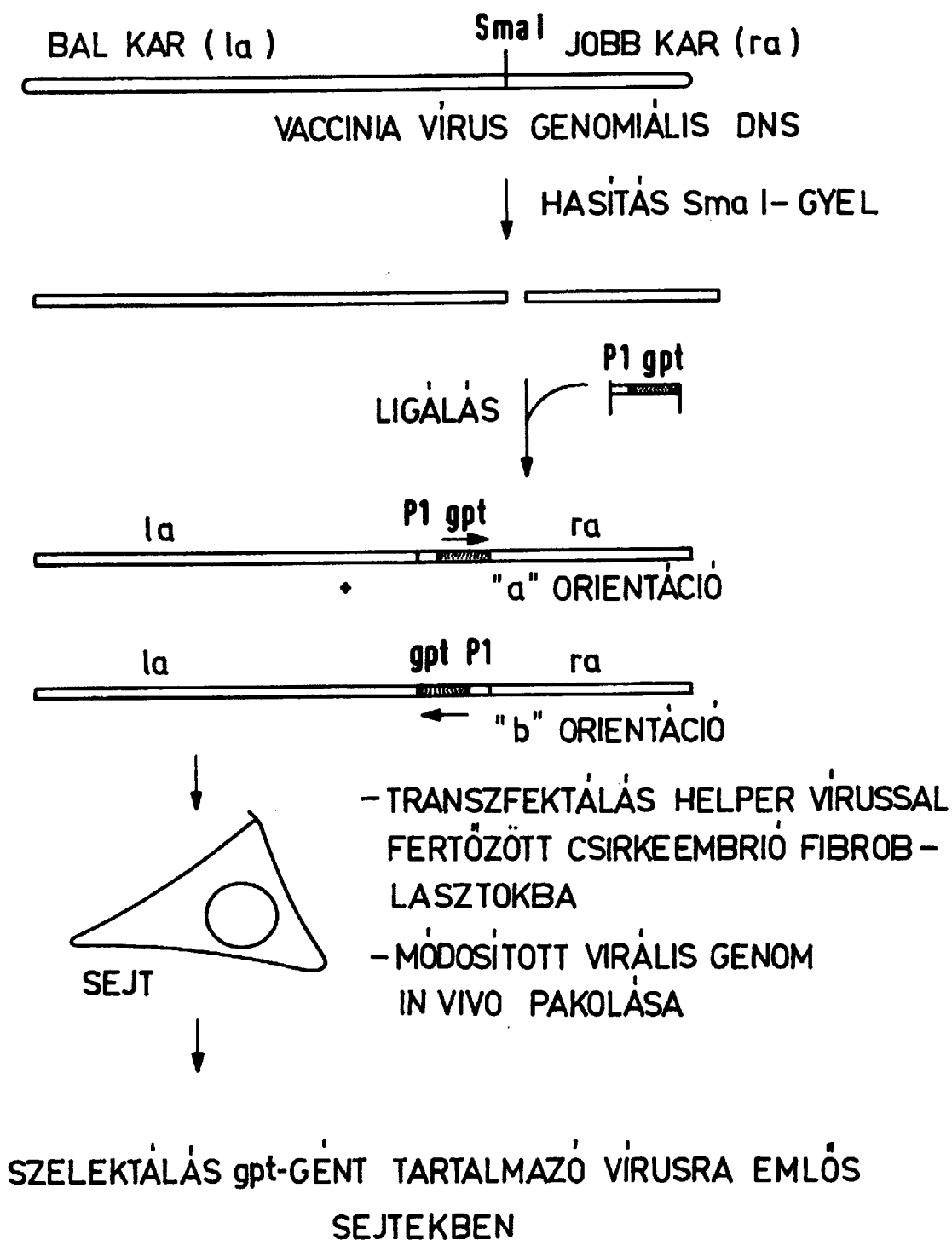
## 2.1 ábra



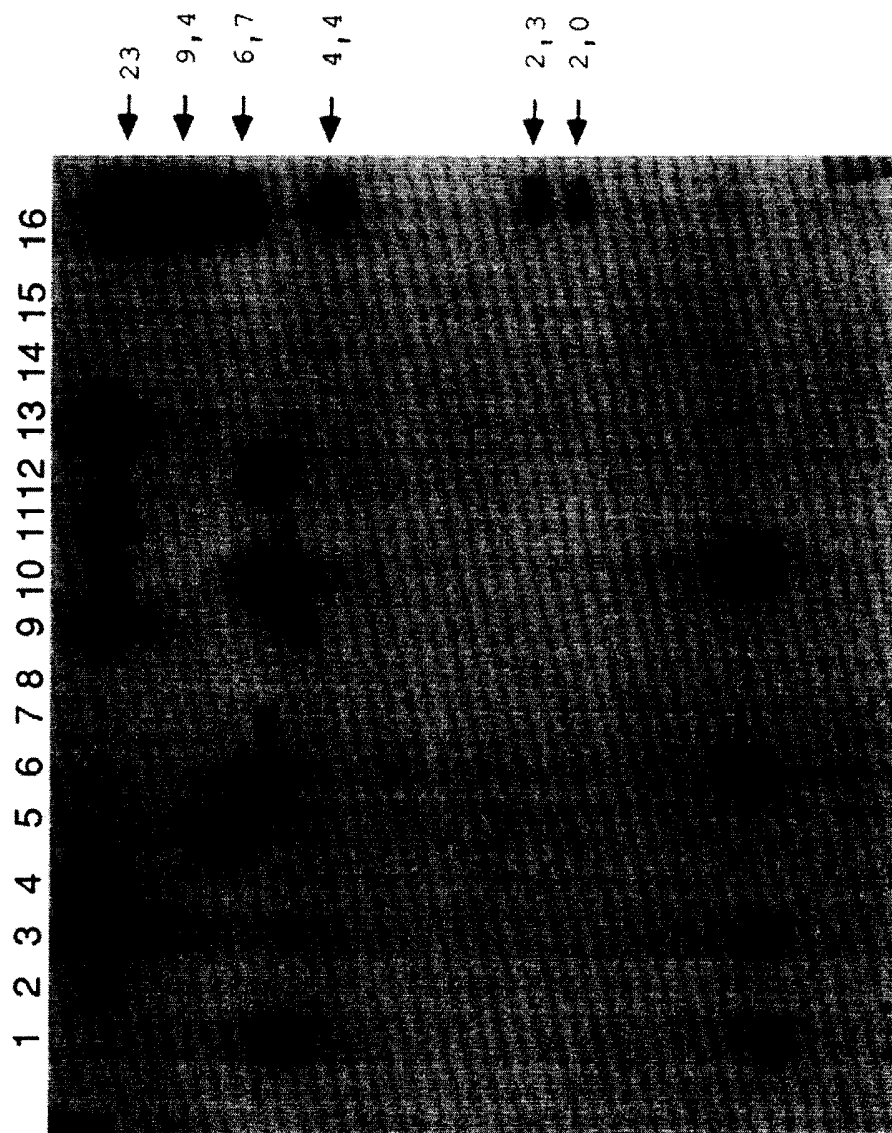
2.2 ábra



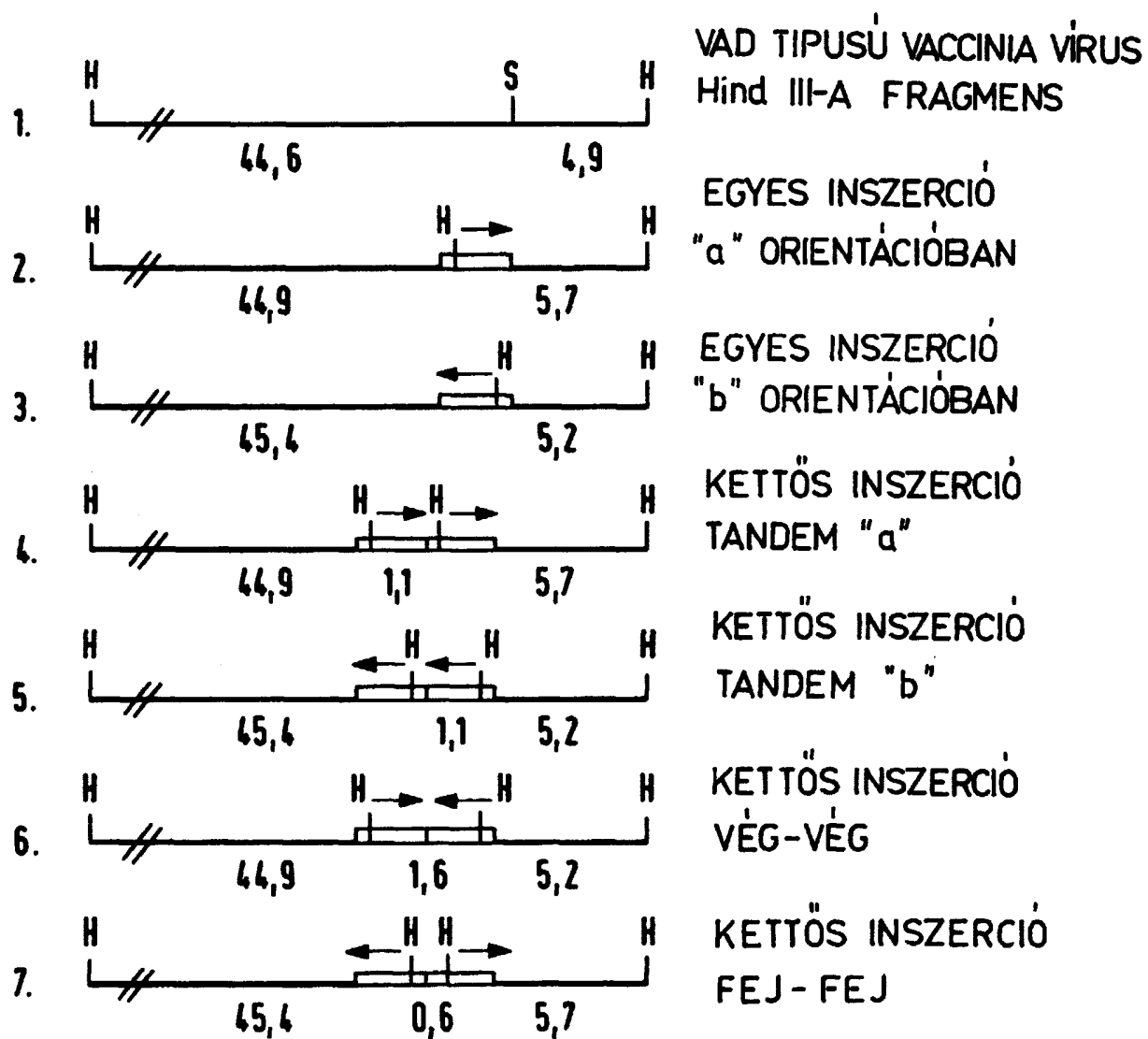
### 3.1 ábra



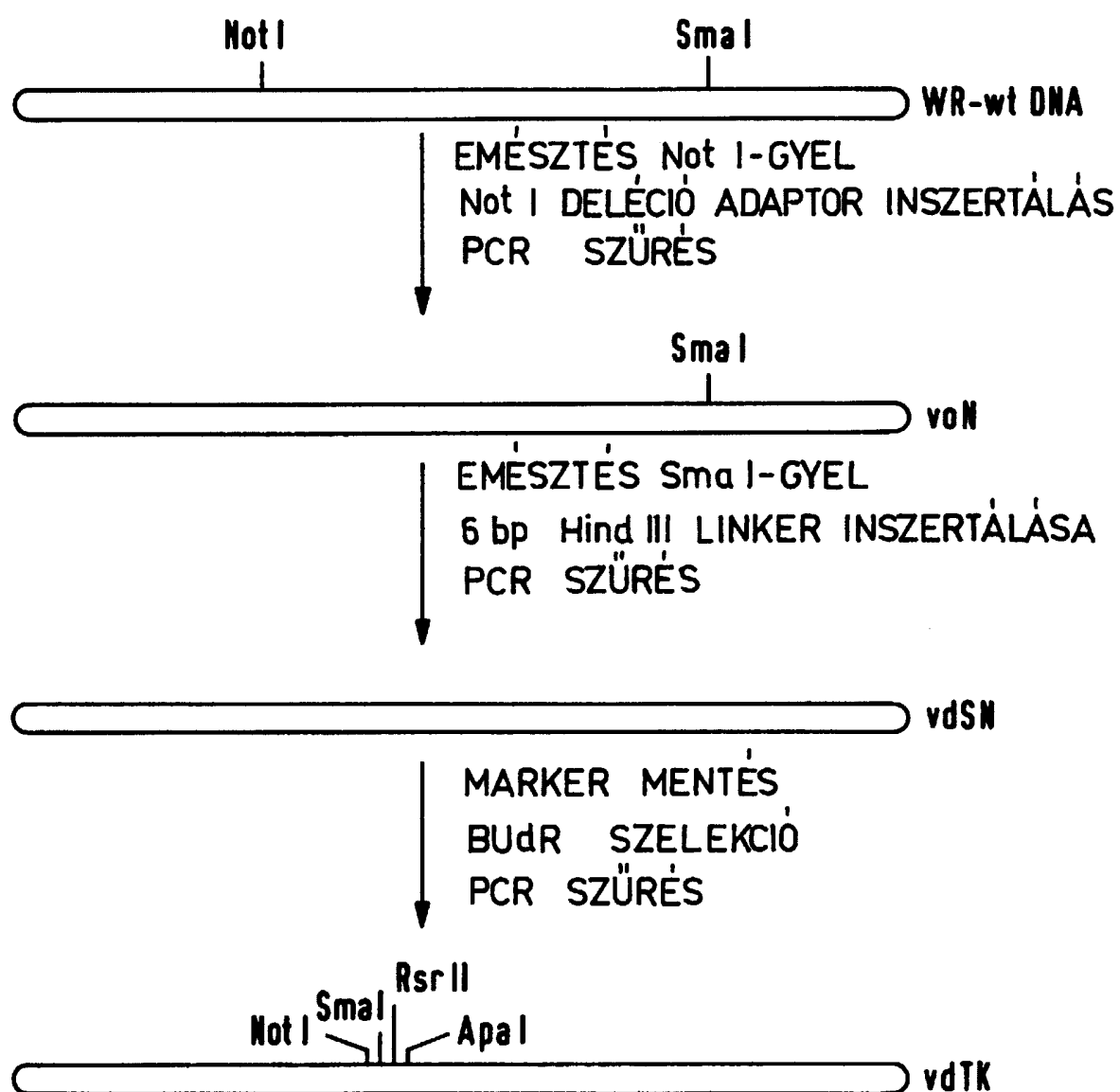
## 3.2 ábra



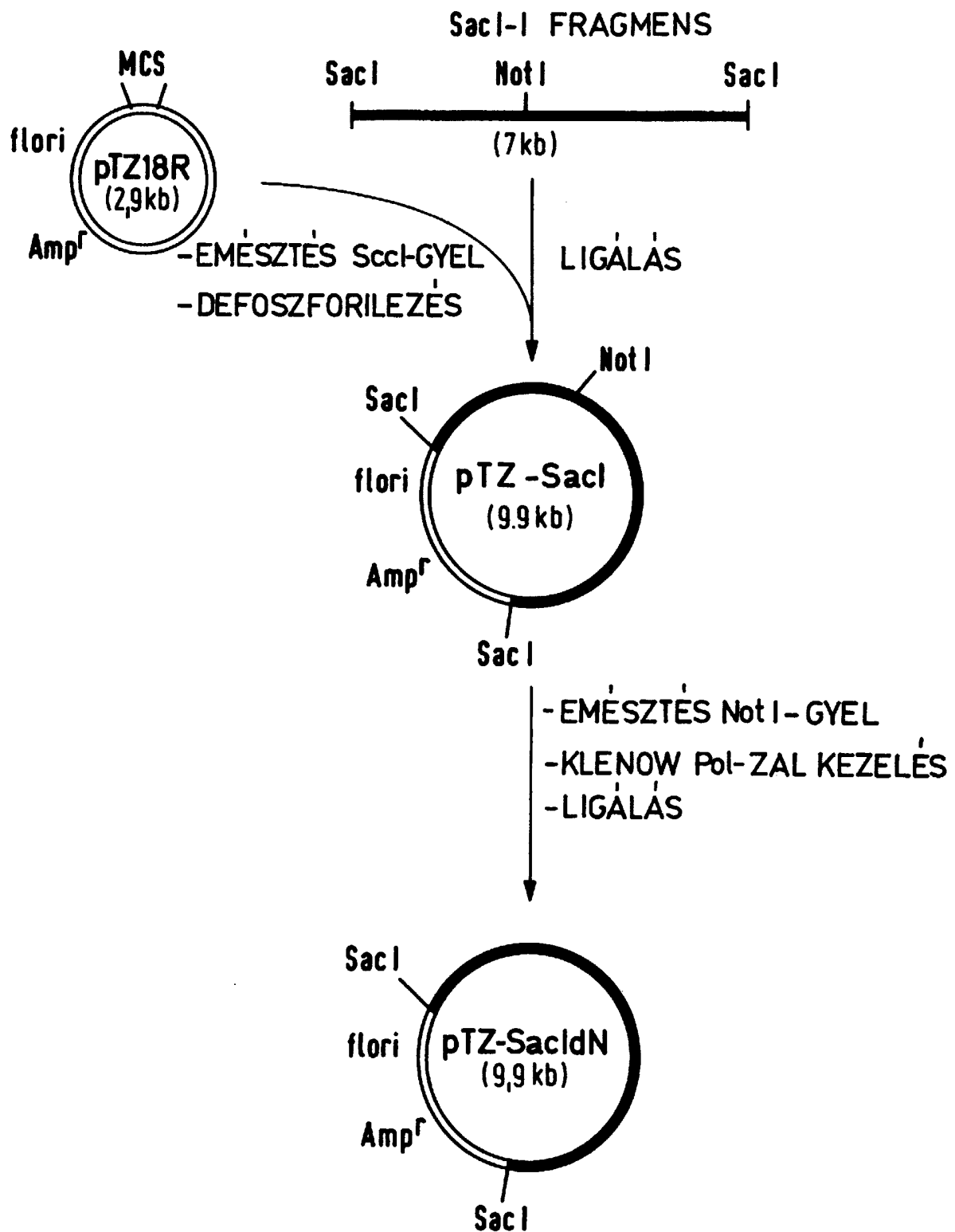
### 3.3 ábra



4.1A ábra

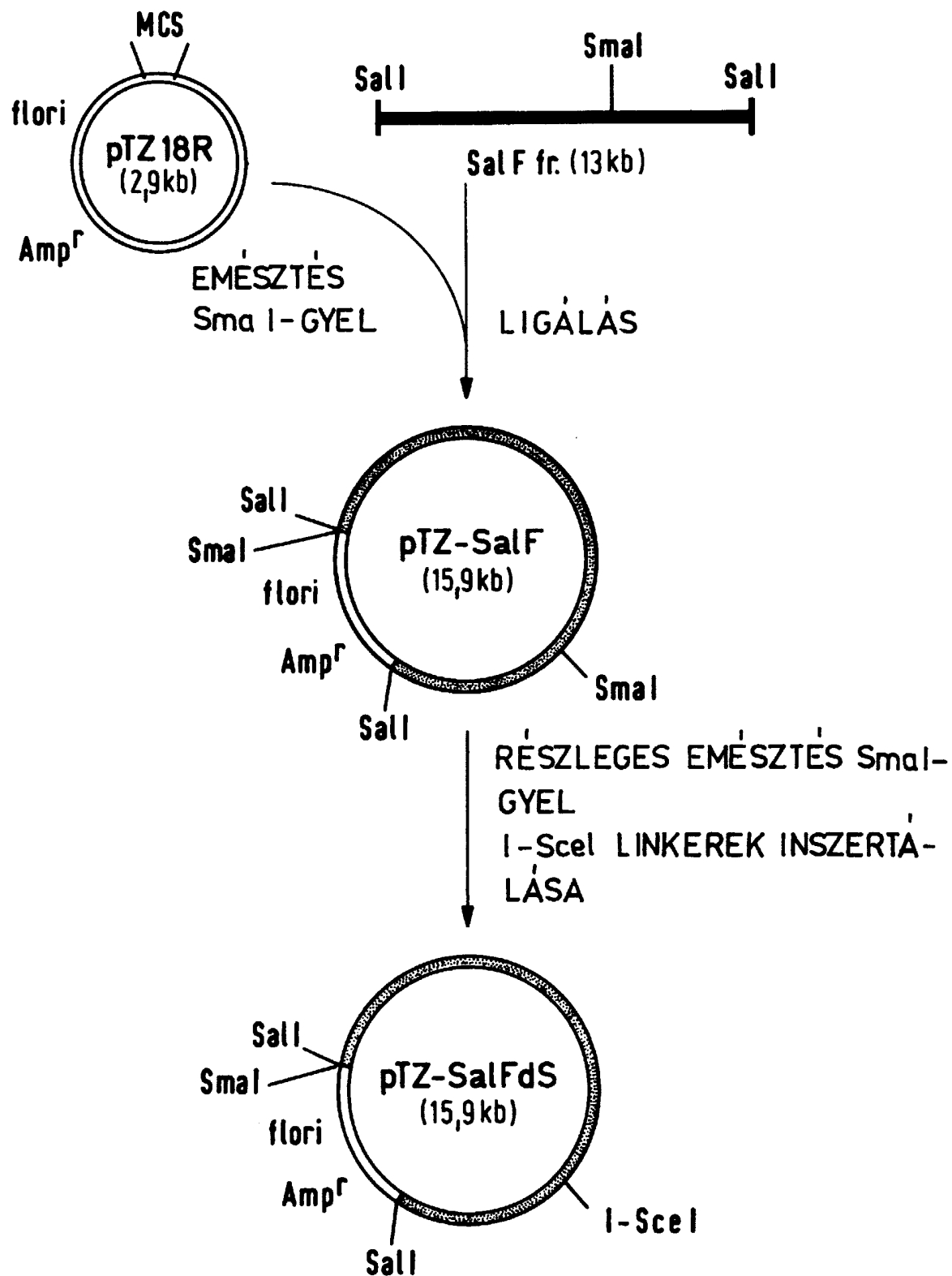


4.1B ábra



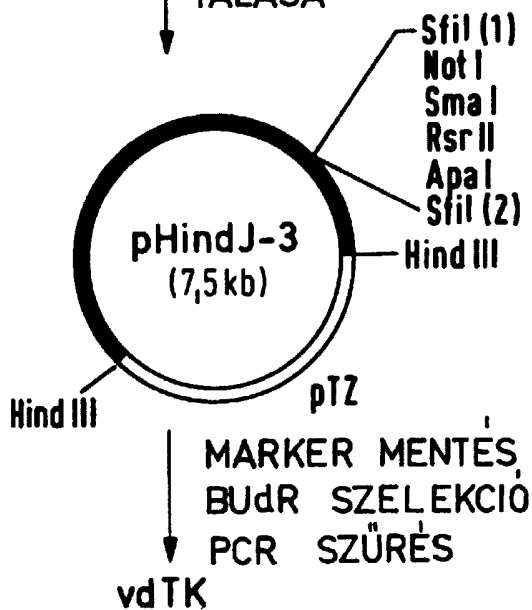
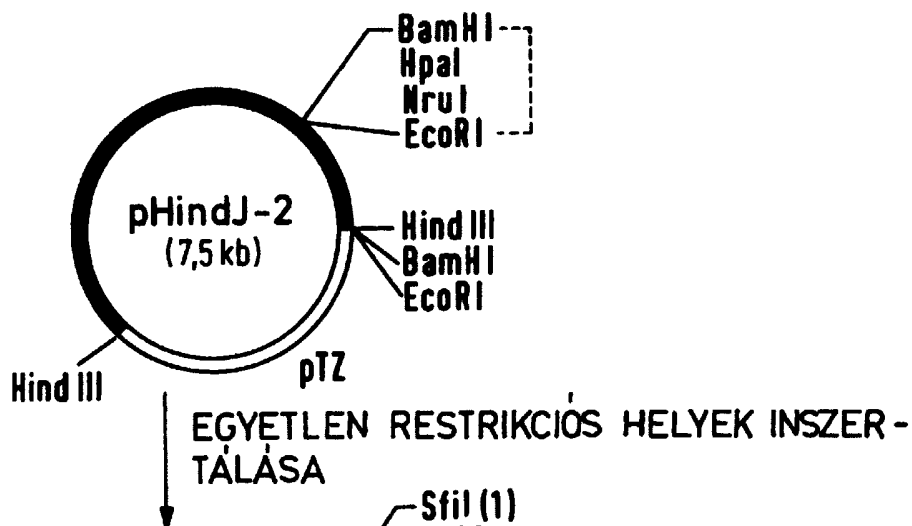
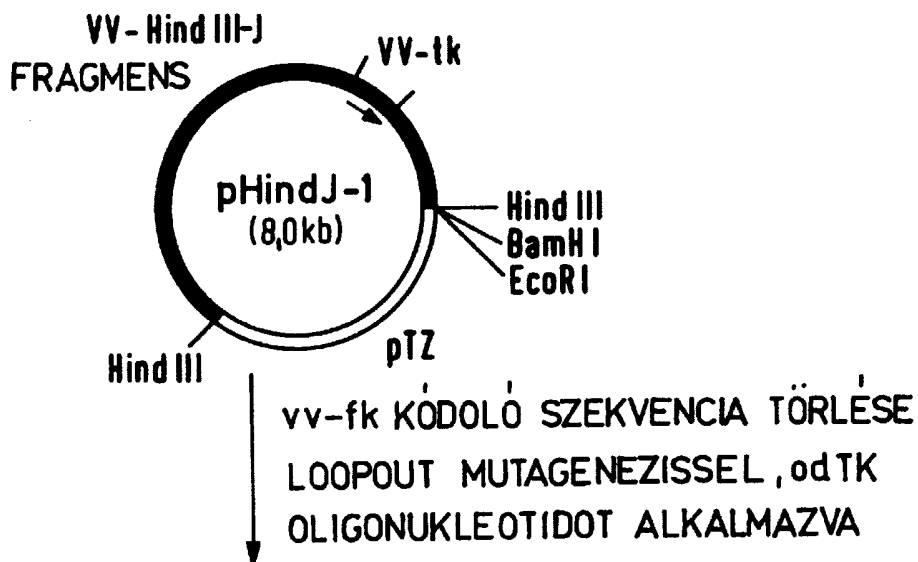
# 4.1C ábra

## pT2 - SalIFH PLAZMID SZERKESZTÉSE



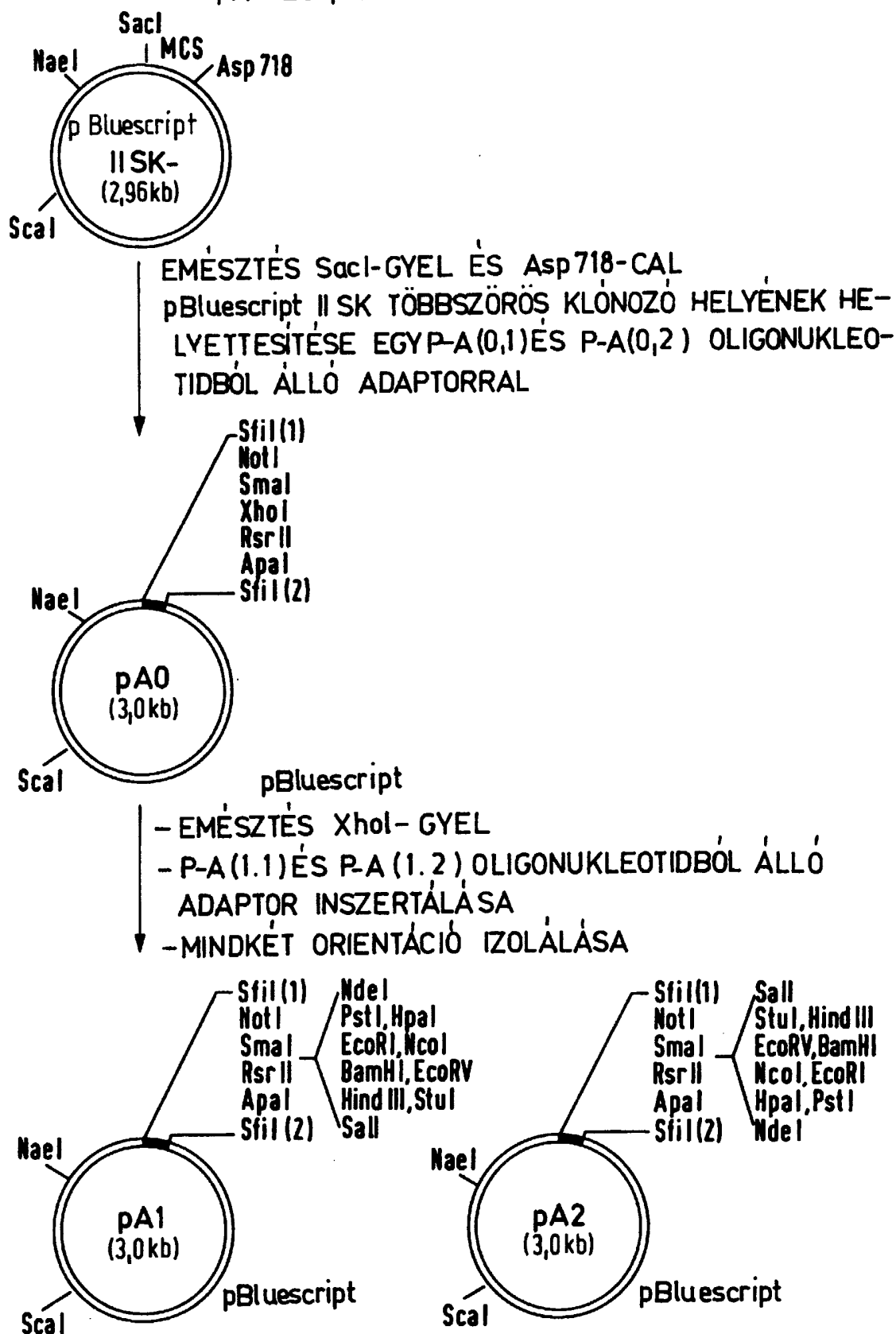
## 4.2 ábra

### pHind J-3 PLAZMID SZERKESZTÉSE

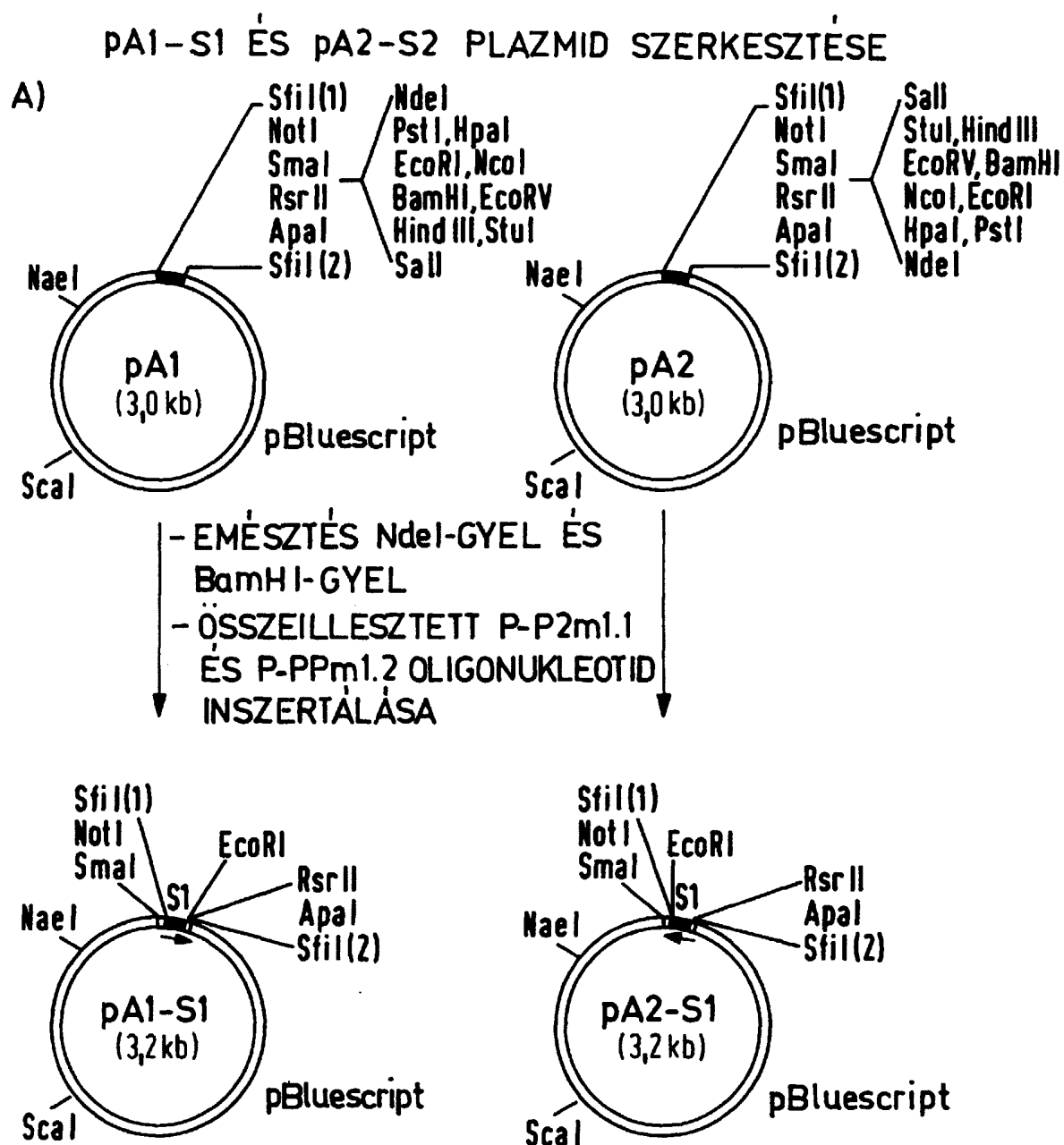


4.3 ábra

pA1 ÉS pA2 PLAZMID SZERKESZTÉSE



4.4 ábra

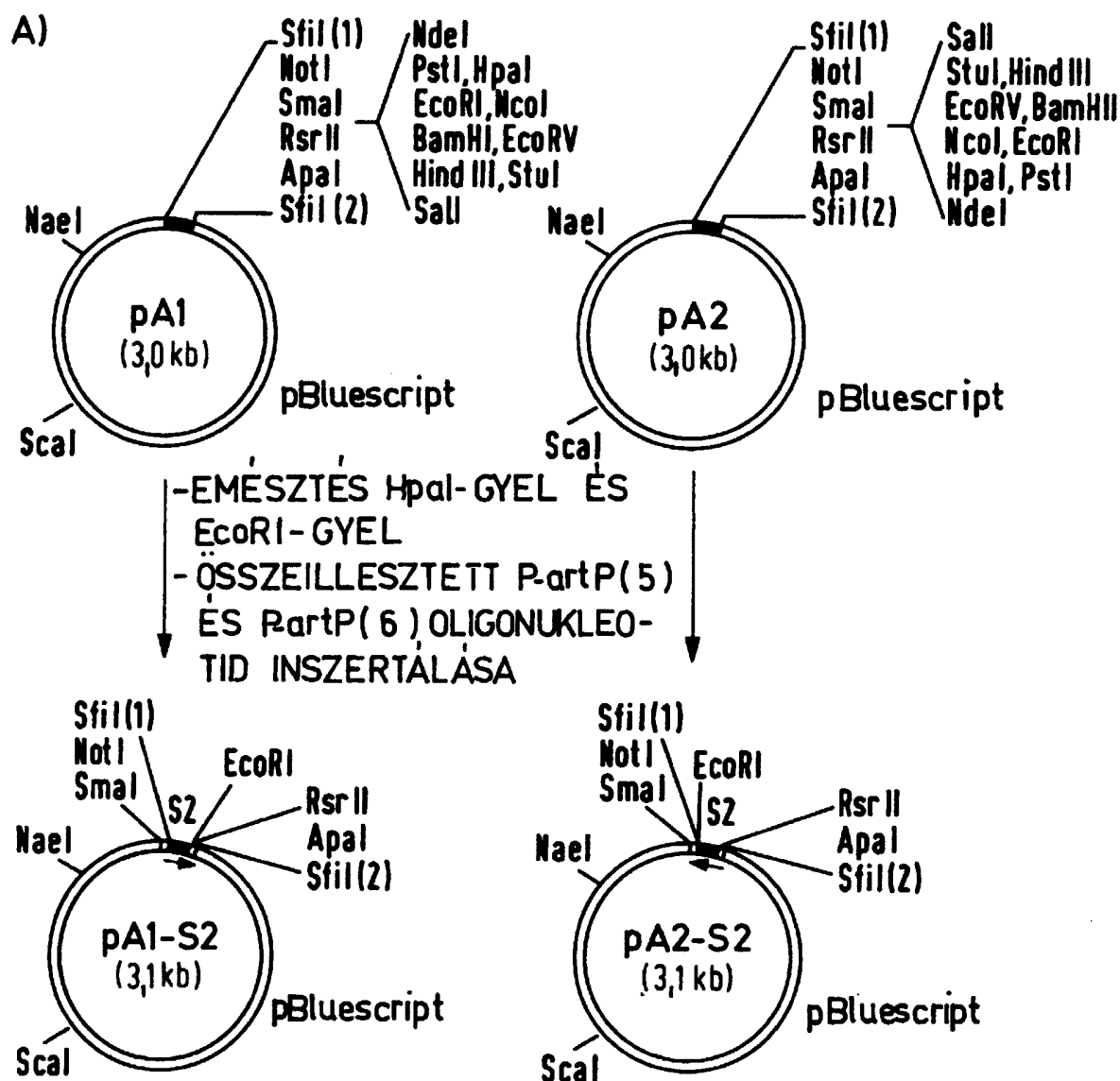


**B) S1 PROMOTER SZERKEZETE**

TACGGCTTGGTATAGCGGACAACTAAGTAATTGTAAGAAGAAAACGAACTATCAAAACCGTTTATGAA  
ATGATAGAAAAAAGAATATAAATAATCCTGTATTTTAGTTTAAGTAACAGTAAAATAATGAGTAGAAAAAT  
ACTATTTTTTATAGCCTATAAATCATGAATTCG  
EcoRI  
→

# 4.5 ábra

## pA1-S2 ÉS pA2-S2 PLAZMID SZERKESZTÉSE

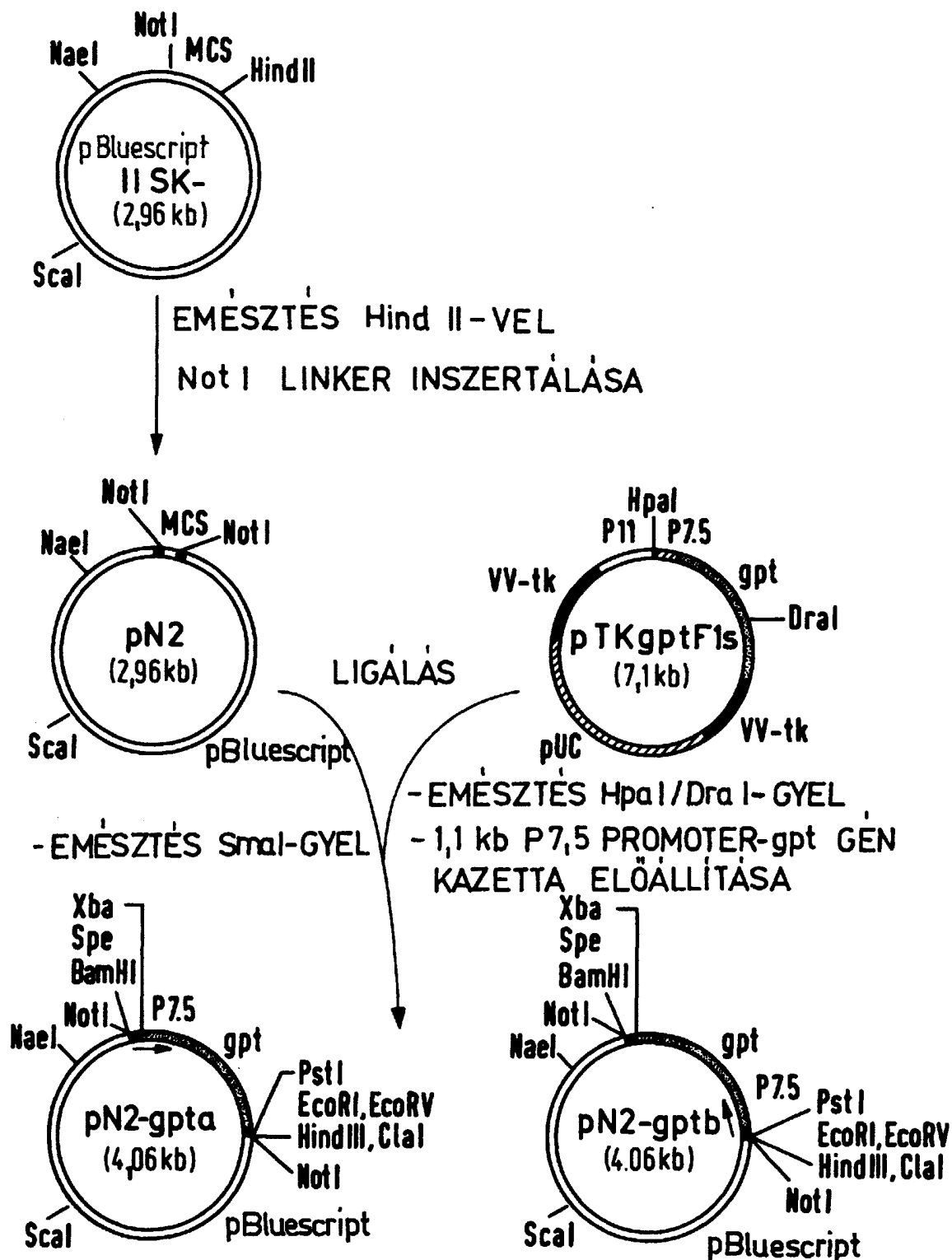


## B) S2 PROMOTER SZERKEZETE

PstI EcoRI  
GGGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAGGCTGCAGGAATTC  
vektor DNS

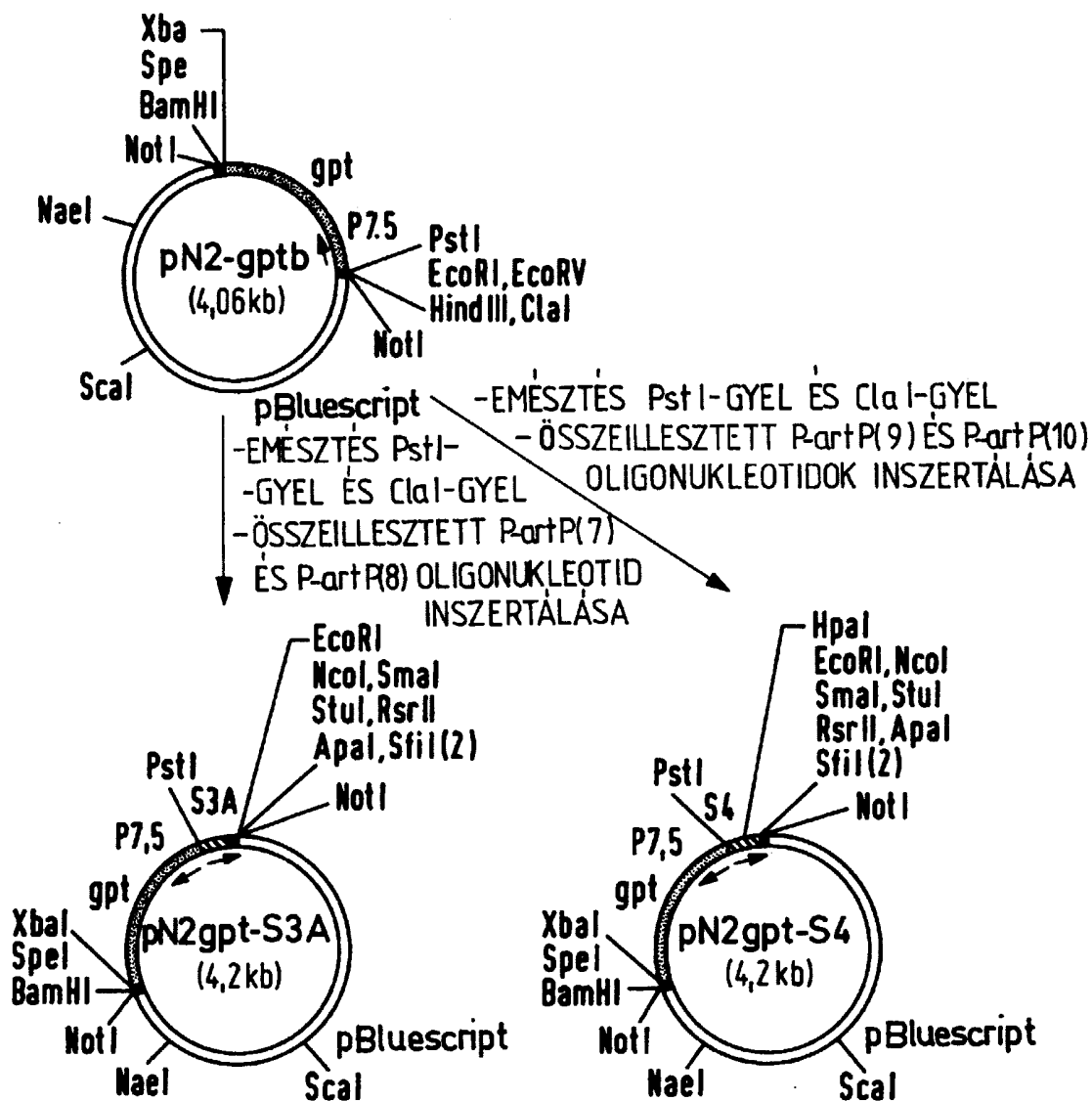
# 4.6 ábra

## PN2-gpt<sup>a</sup> ÉS PN2-gpt<sup>b</sup> PLAZMID SZERKESZTÉSE



# 4.7 ábra

## pN2gpt-S3 ÉS pN2gpt-S4 PLAZMID SZERKESZTÉSE



### S3A PROMOTER SZERKEZETE

S3A → EcoRI NcoI SmaI StuI RsrII ApaI SfiI(2)

GAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATGAATTCATGGCCCGGAAGGCTCGGACCGGGCCCGGCATATAGGCCAG

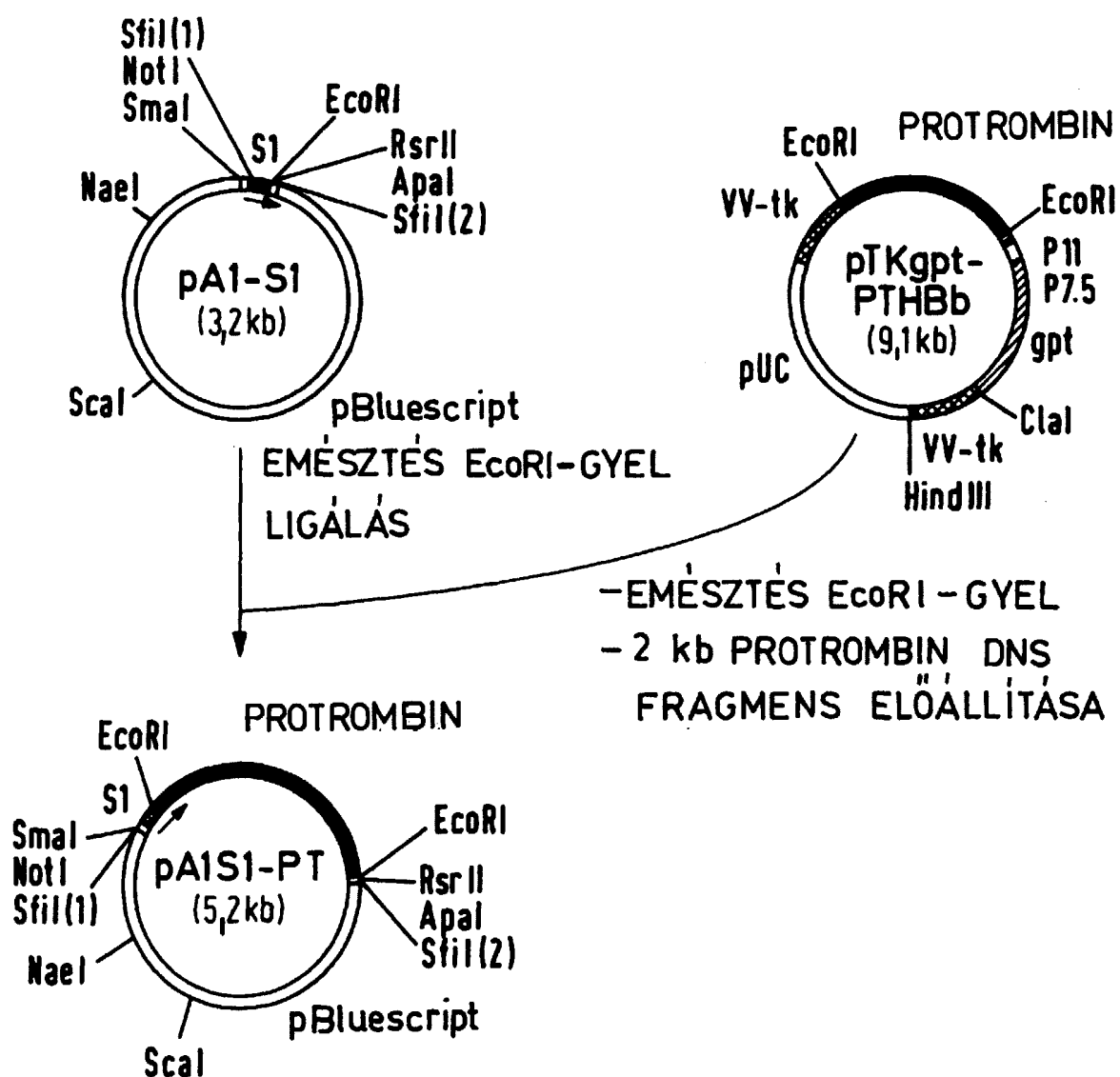
### S4 PROMOTER SZERKEZETE

S4 → HpaI EcoRI NcoI SmaI StuI RsrII ApaI SfiI(2)

GAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATCGTTAACEGAATTCATGGCCCGGAAGGCTCGGACCGGGCCCGGCATATAGGCCAG

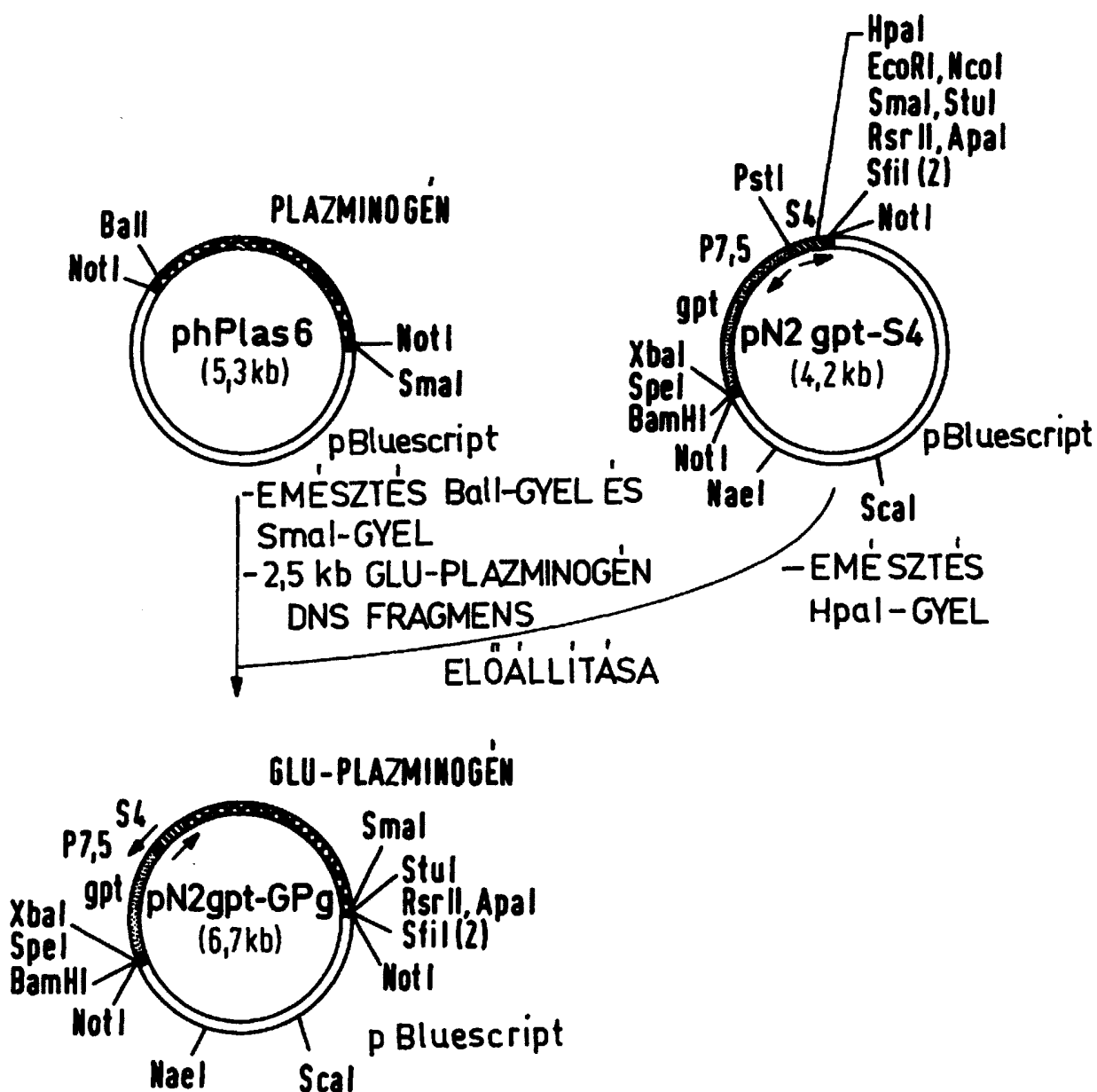
# 5.1 ábra

## pA1S1 PLAZMID SZERKESZTÉSE



## 5.2 ábra

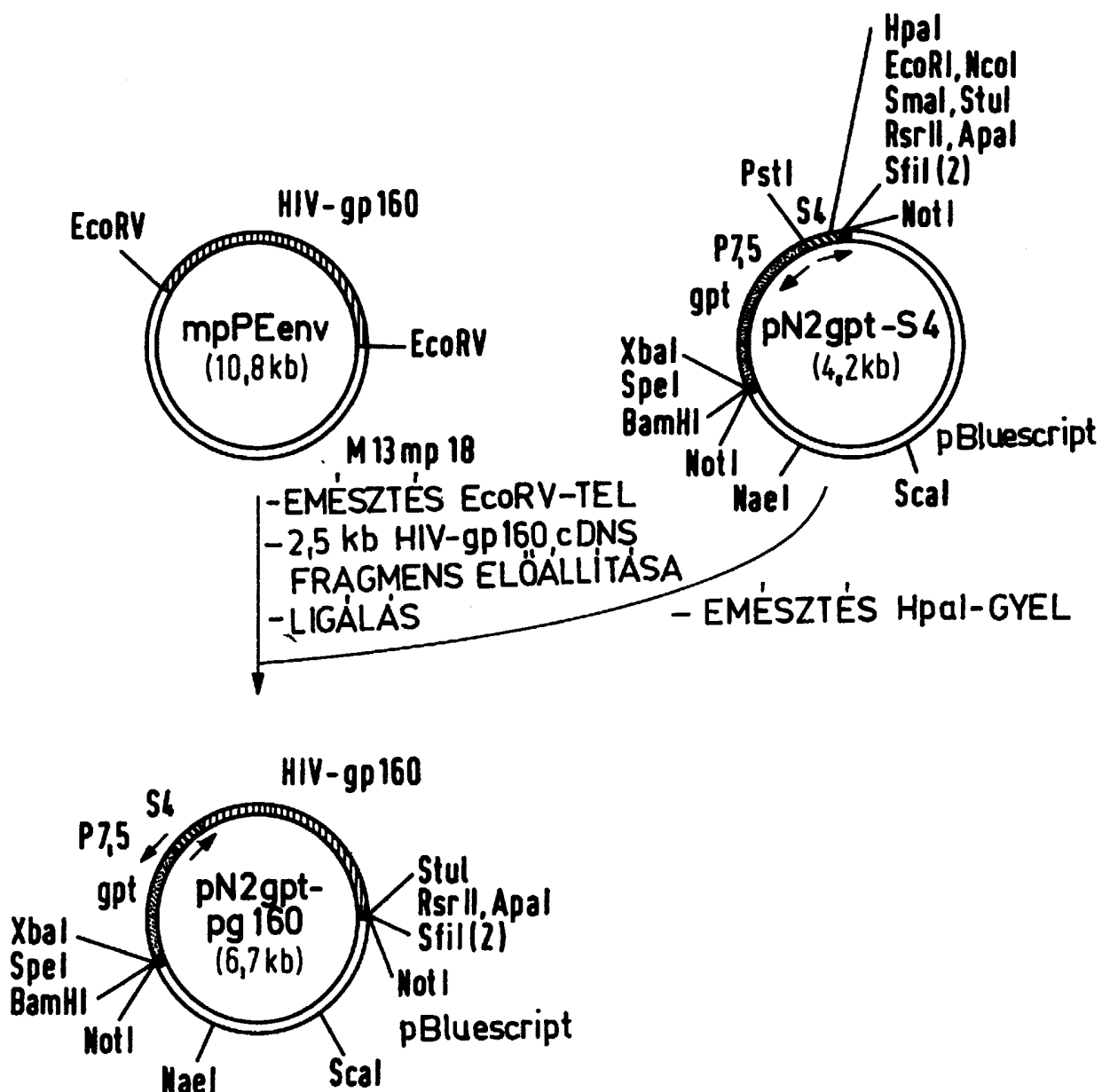
### pN2 gpt-GPg PLAZMID SZERKESZTÉSE





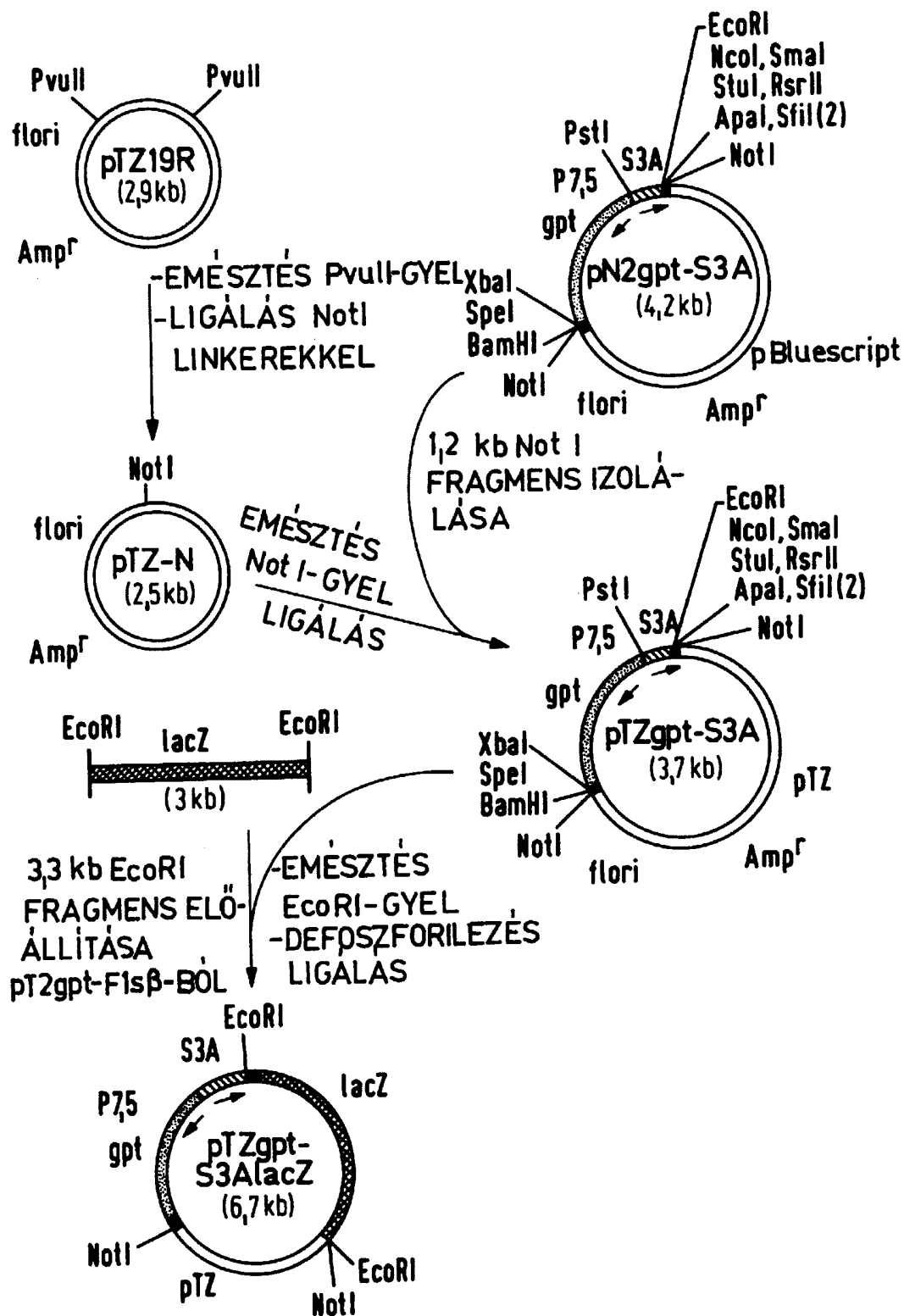
# 5.4 ábra

## pN2 gpt - gp160 PLAZMID SZERKESZTÉSE



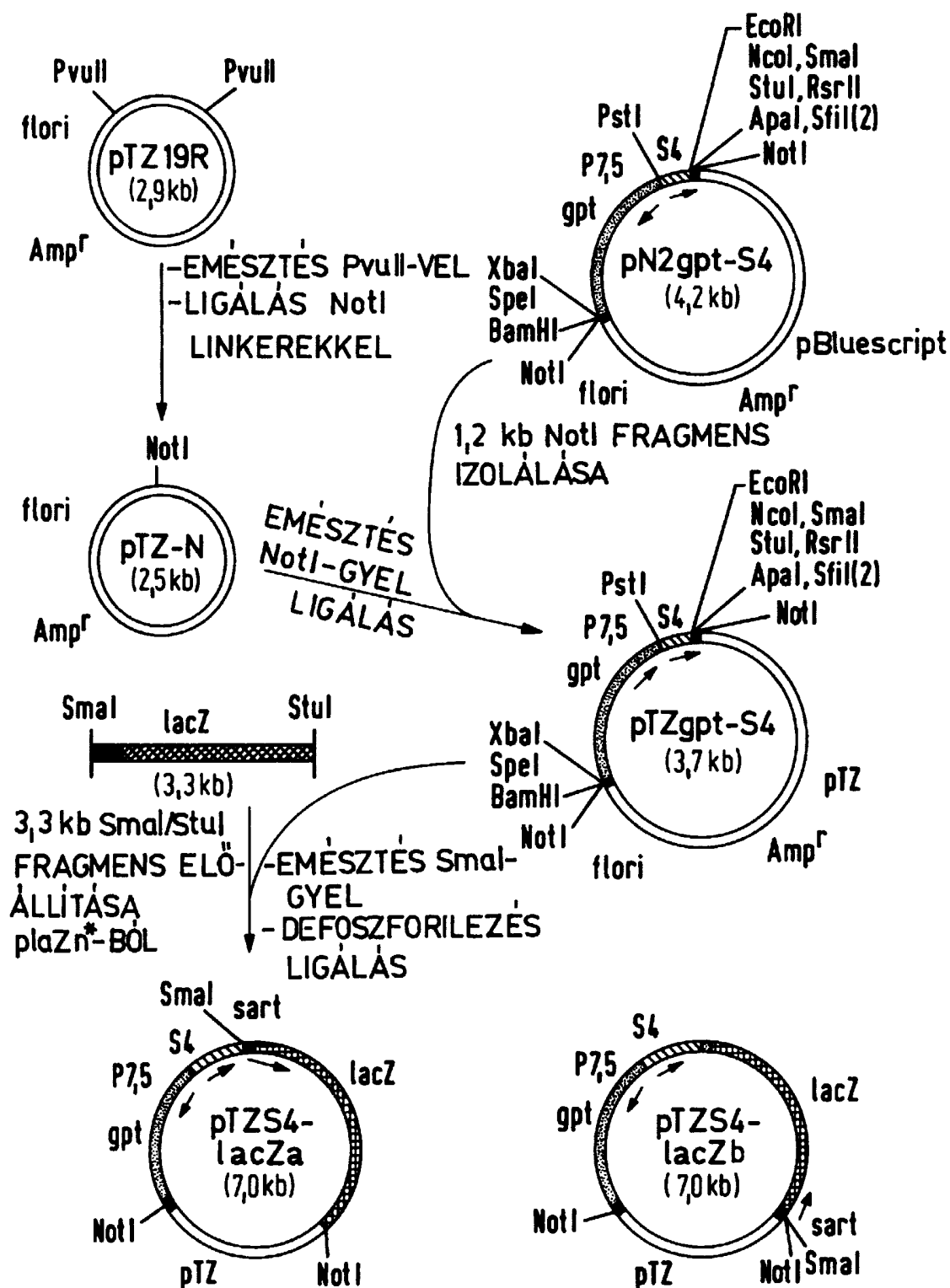
## 5.5 ábra

### pT2gpt-S3 AlacZ PLAZMID SZERKESZTÉSE



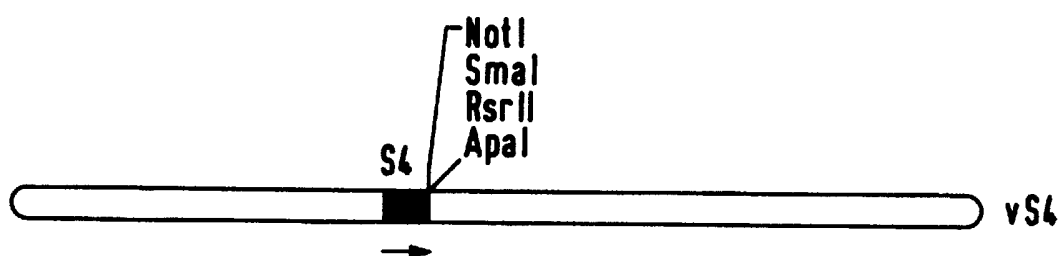
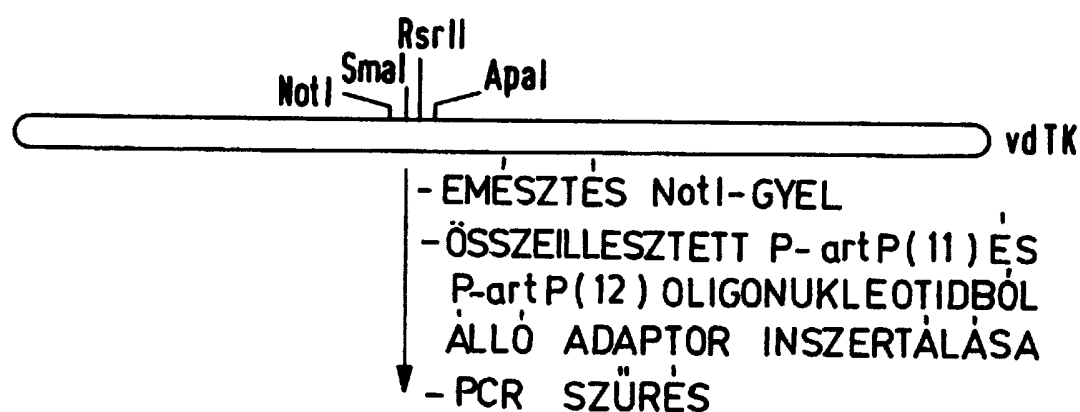
5.6 ábra

pT2S4-lacZa/b PLAZMIDOK ELŐÁLLÍTÁSA

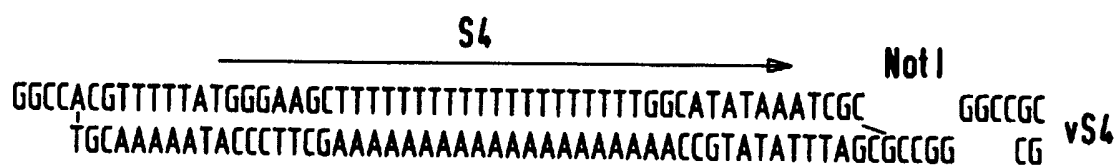


# 6.1 ábra

## VVvS4 VEKTOR SZERKESZTÉSE

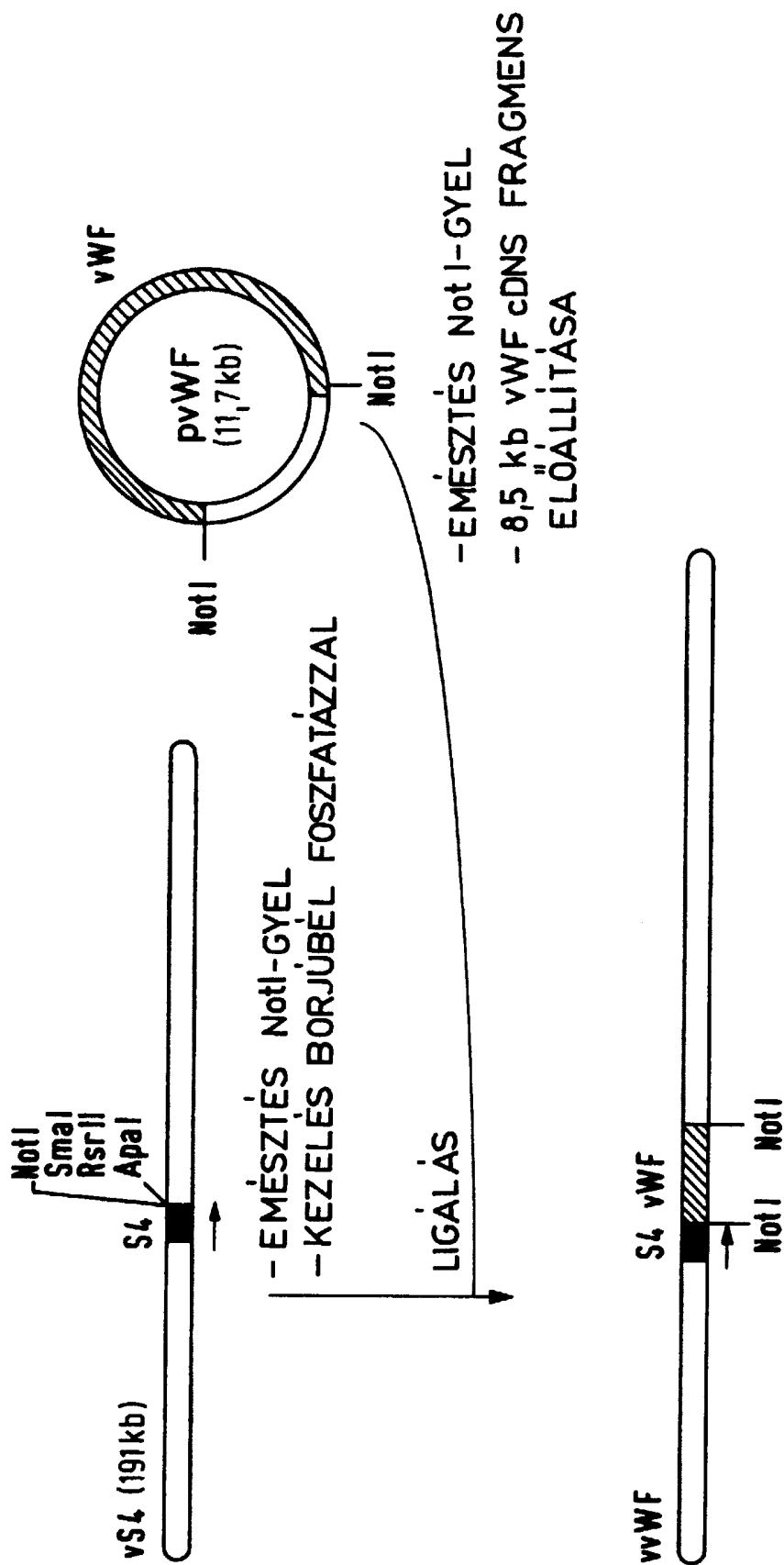


## PROMOTER-ADAPTOR SZERKEZETE A vS4-BEN



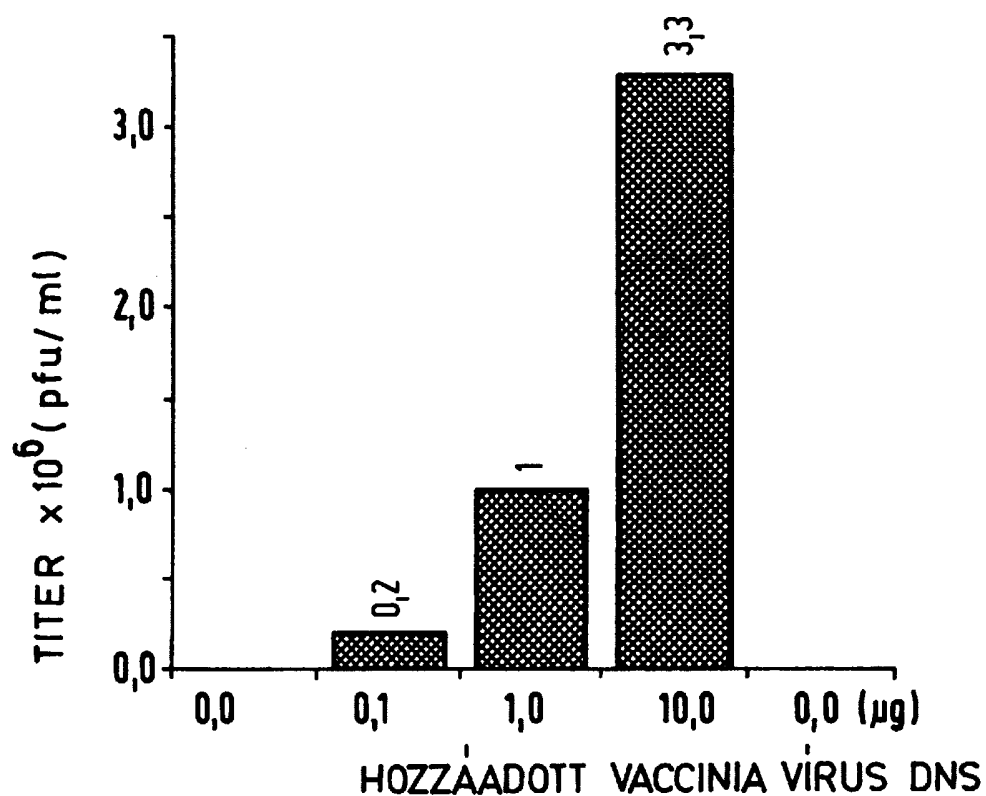
## 6.2 ábra

### vWF VACCINIA VIRUS TÖRZS SZERKESZTÉSE



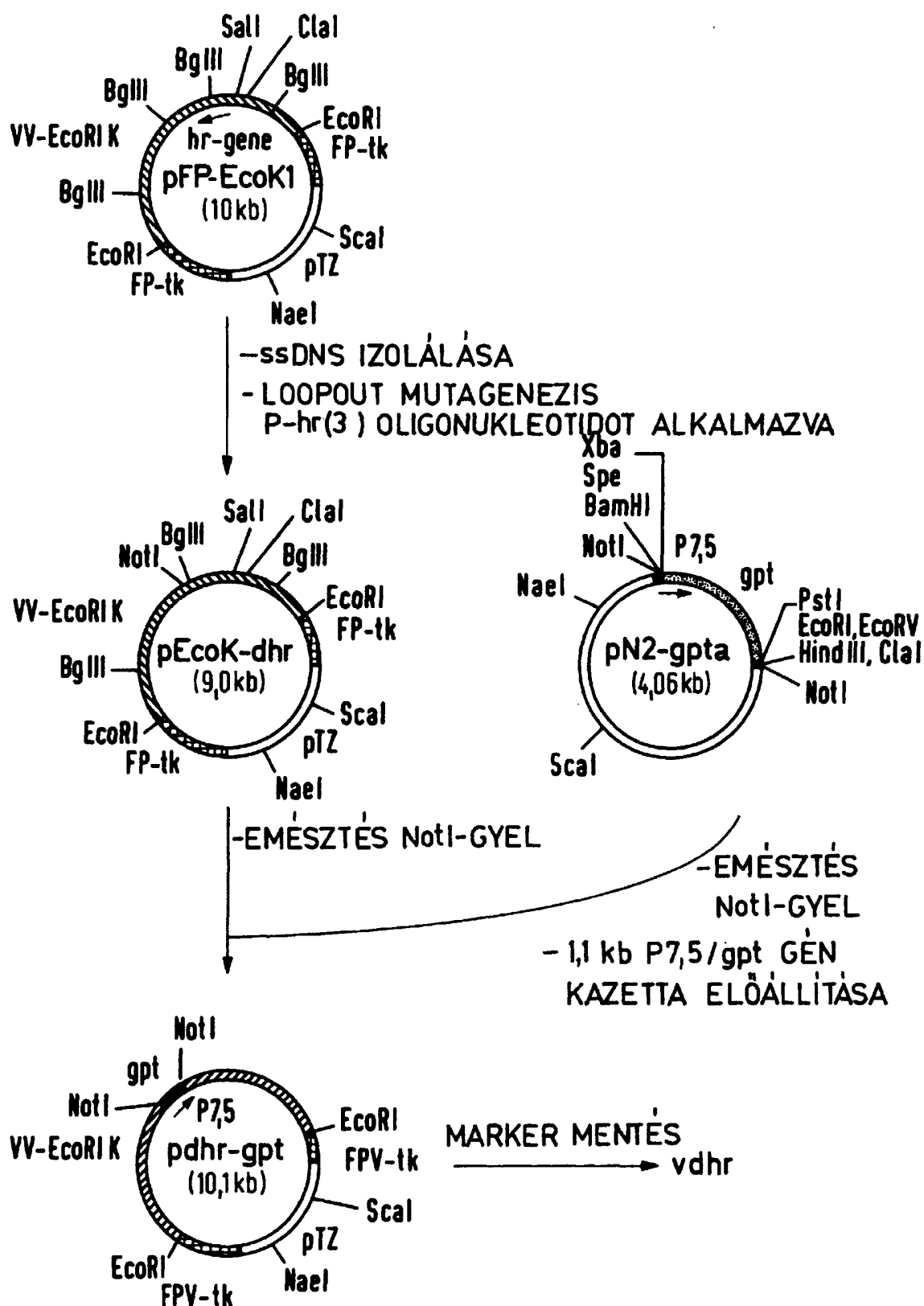
7.1 ábra

VACCINIA VÍRUS DNS IN VIVO PAKOLÁSA  
SZÁRNYAS-POXVÍRUSSEL EMLŐS SEJTEKBEN (CU-1 )



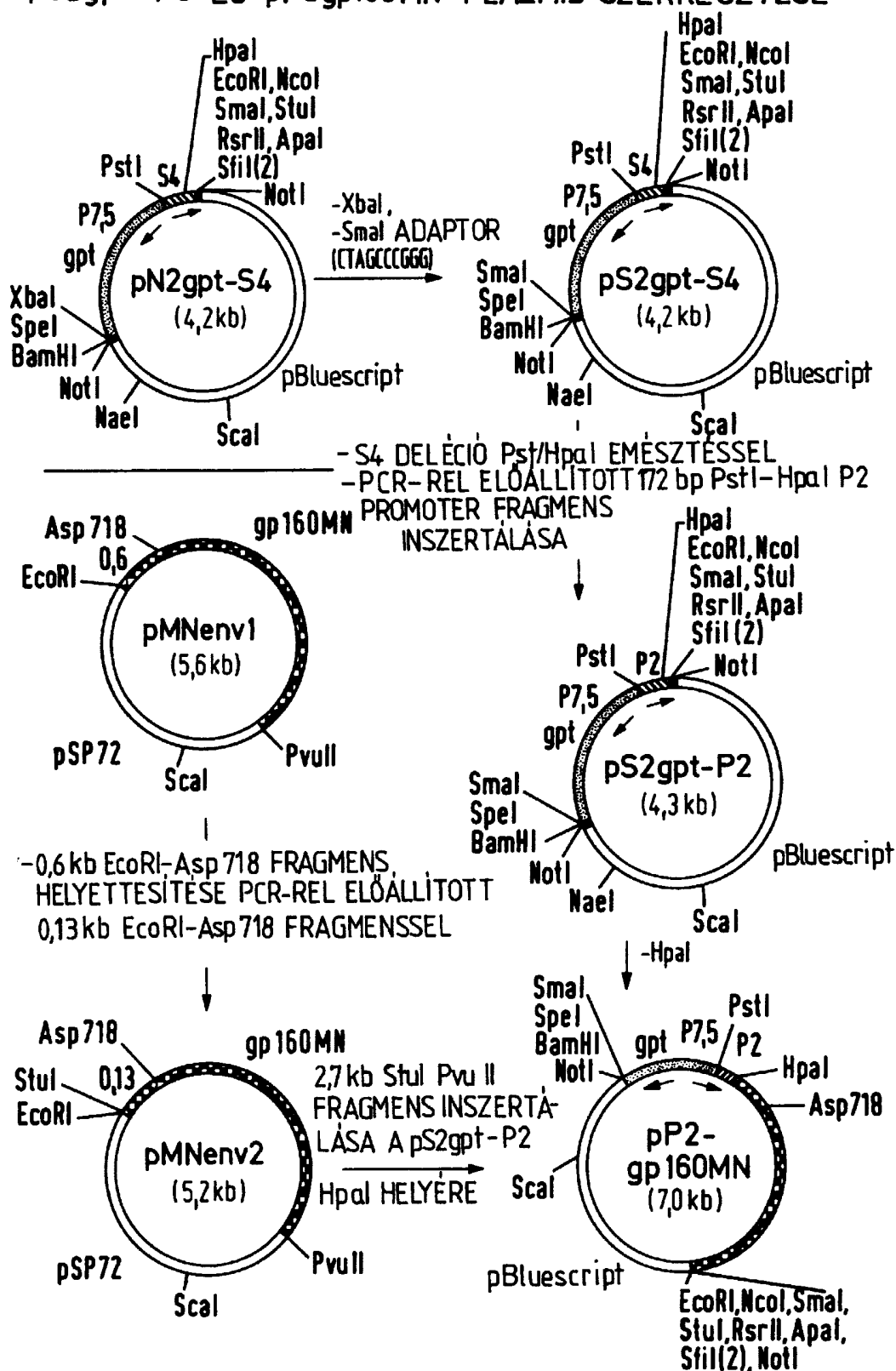
8.1 ábra

pEcoK-dhr PLAZMID SZERKESZTÉSE



9.1 ábra

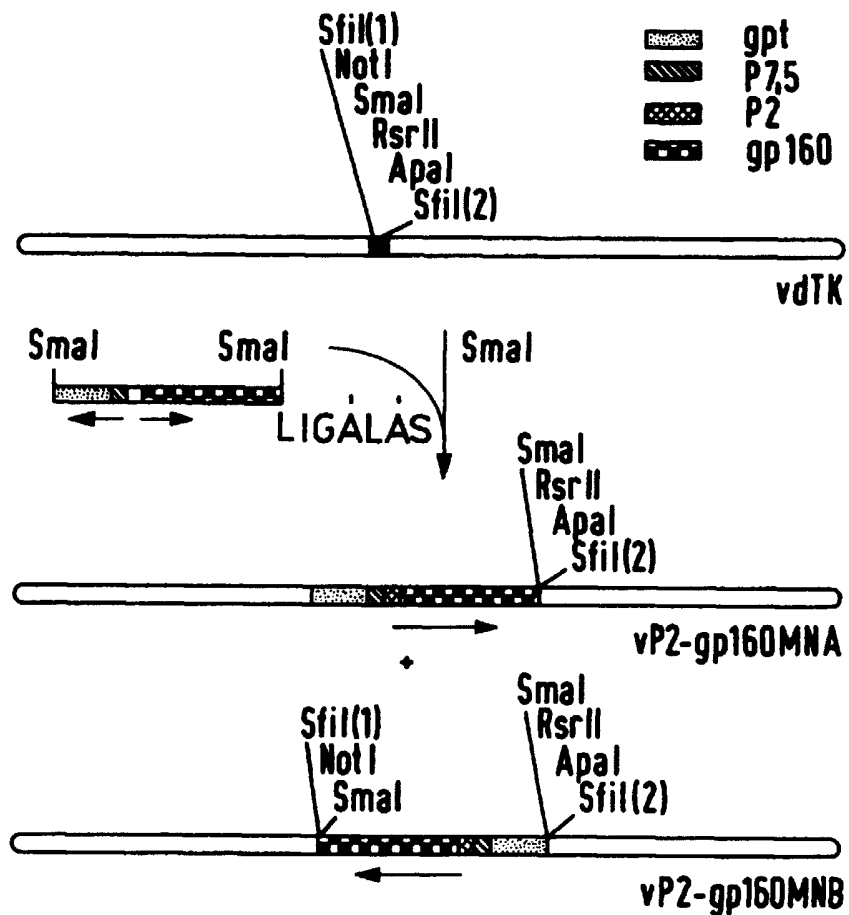
PS2gpt-P2 ÉS pP2gp160MN PLAZMID SZERKESZTÉSE



## 9.2 ábra

### vP2-gp160MNA ÉS vP2-gp160MNB VÍRUSOK SZERKESZTÉSENEK SEMATIKUS VÁZLATA

### vP2-gp160 MNA ÉS vP2-gp160 MNB KIMÉRA VÍRUSOK SZERKESZTÉSE

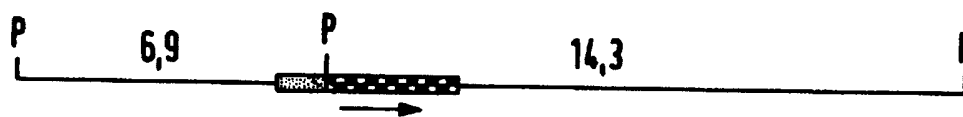


9.3 ábra

Pst I-E FRAGMENS (VAD TIPUSÚ VÍRUS)



Pst I · FRAGMENS vP2-gp 160 MNA - BAN

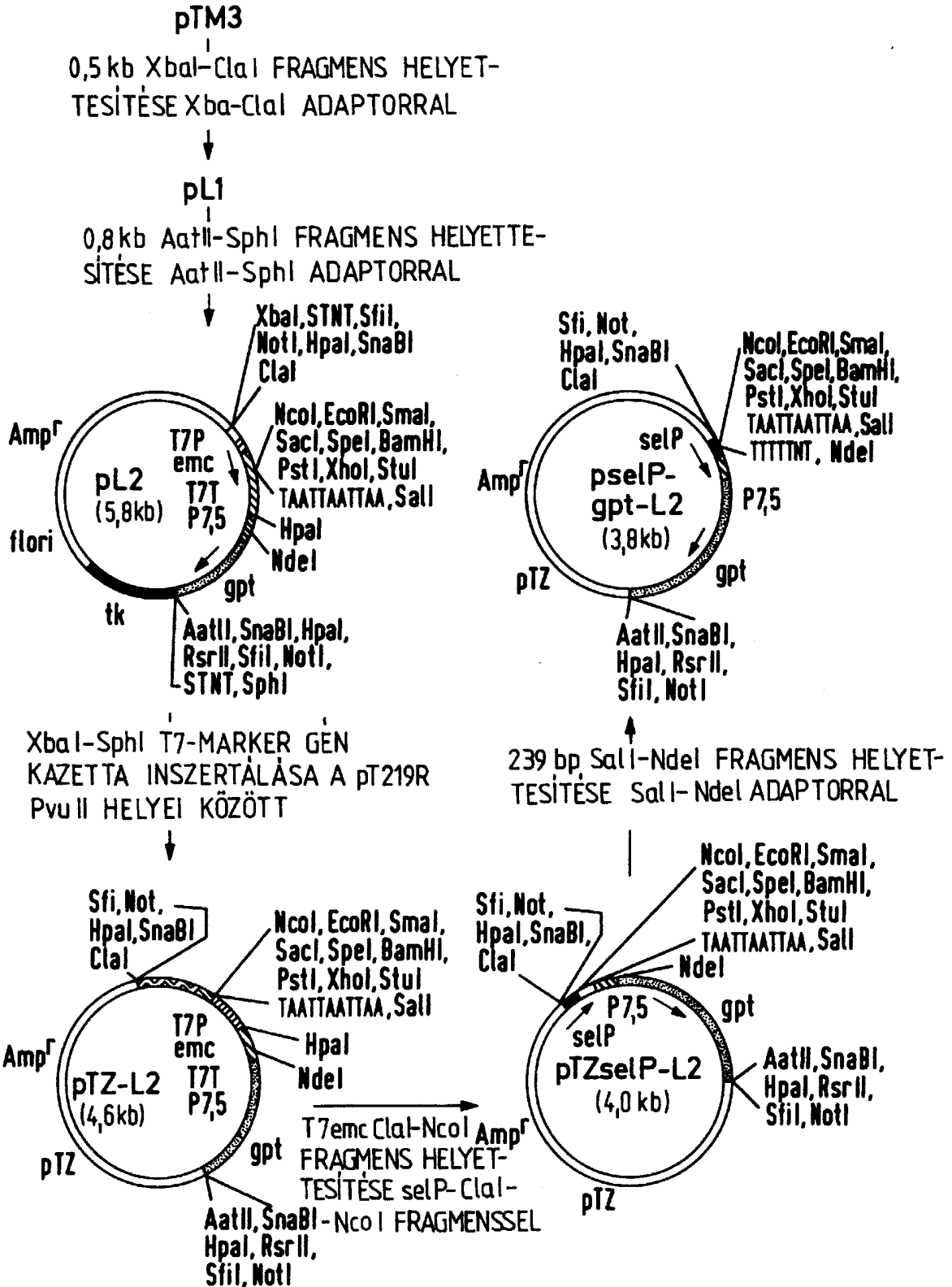


vP2-gp 160 MNB - BEN



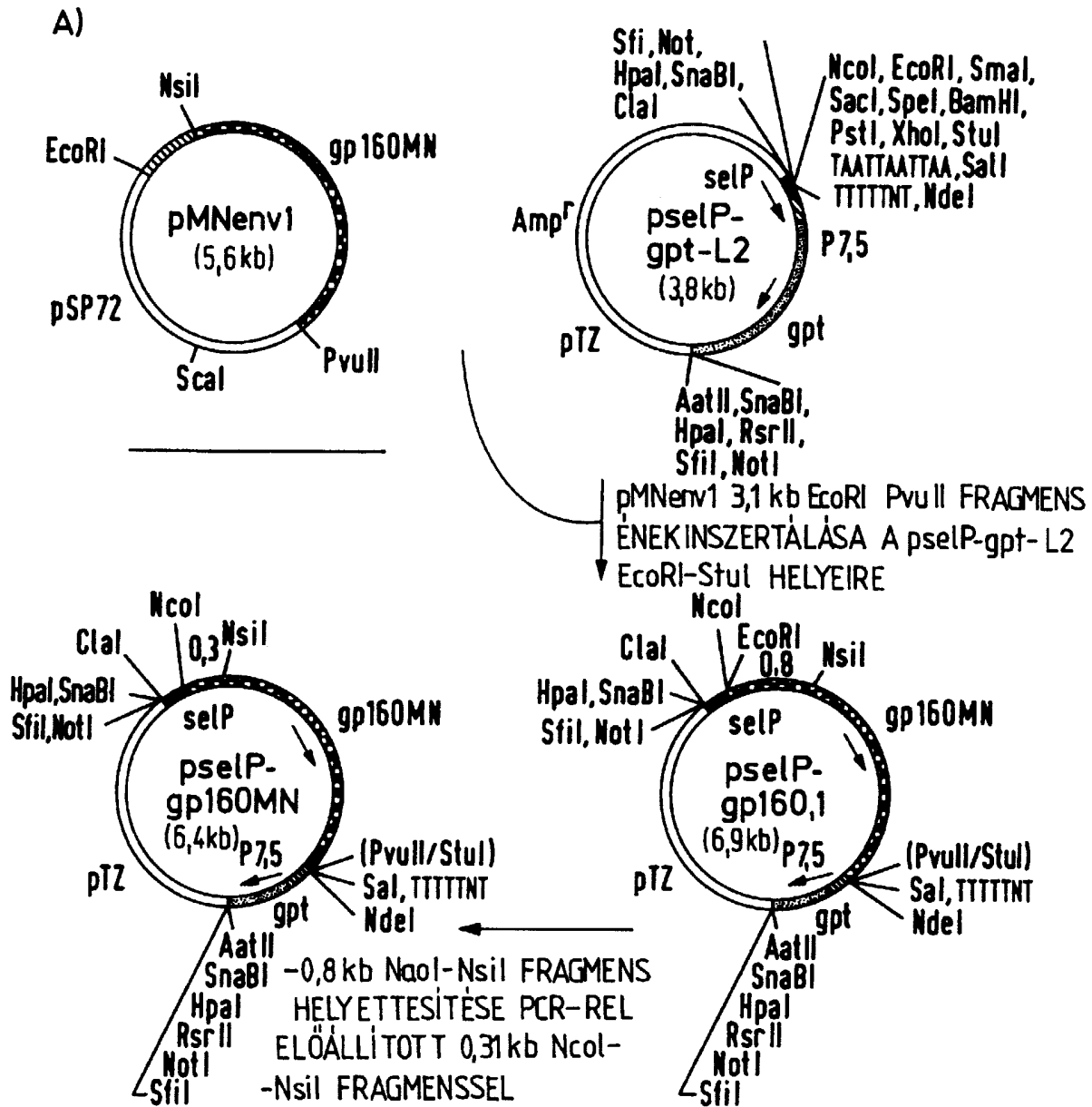
9.4 ábra

pT2-L2, pT2 sel P-L2 ÉS psel P-gpt-L2 PLAZMID  
SZERKESZTÉSE



# 9.5 ábra

## p sel P- gp 160 MN PLAZMID SZERKESZTÉSE



## B)

VAD TIPUSÚ gp 160 MN : MET ARG VAL LYS  
CA ATG AGA GTG AAG

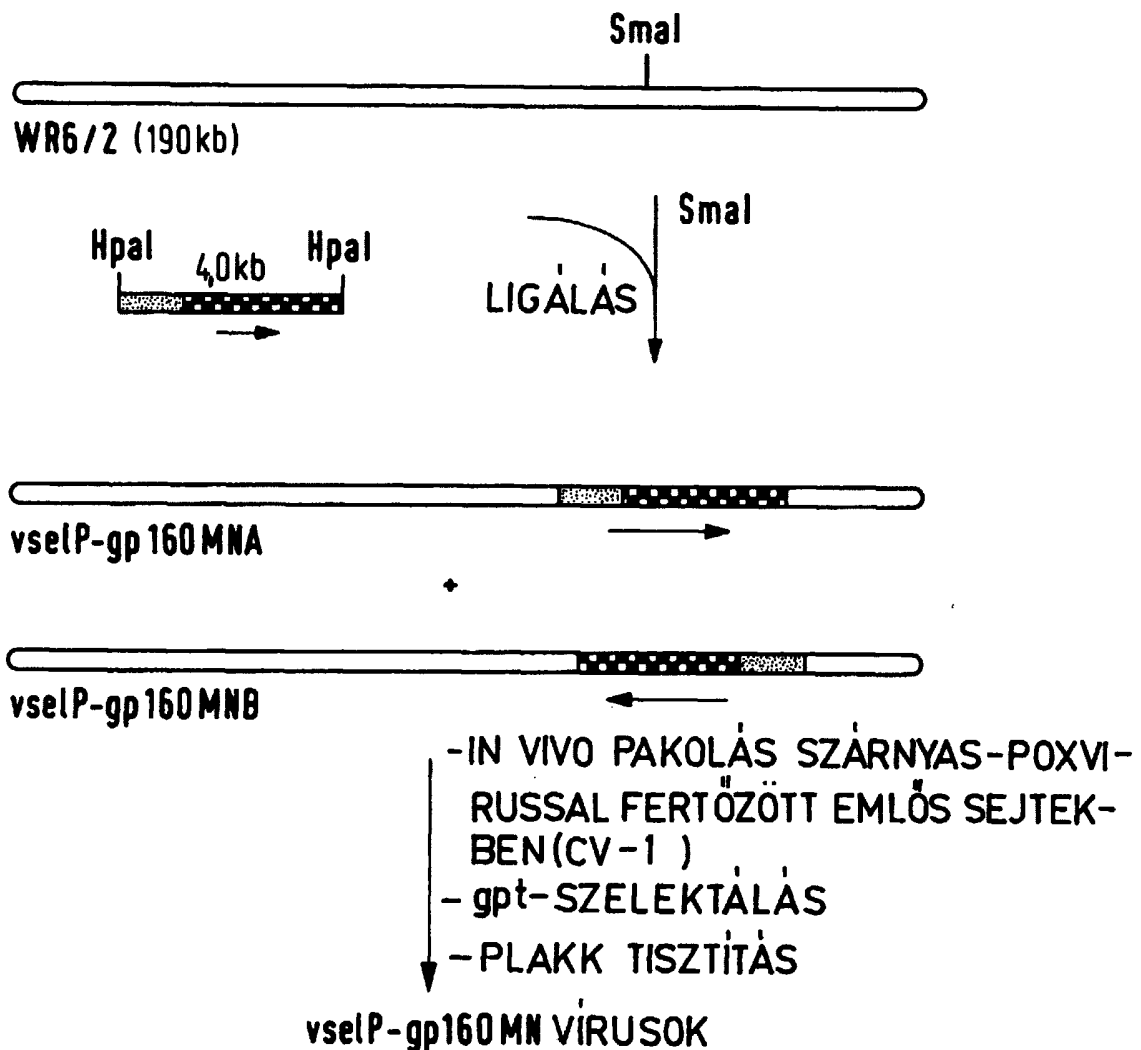
gp160 v sel P-gp160 MET ALA VAL LYS  
VÍRUSBAN: CC ATG GCC GTG AAG  
NcoI

## 9.6 ábra

### vselP-gp160MNA ÉS vselP-gp160MNB VÍRUSOK SZERKESZTÉSÉNEK SEMATIKUS VÁZLATA

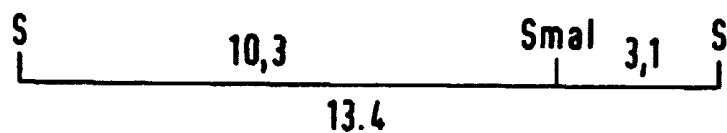
### vselP-gp160MNA ÉS vselP-gp160MNB KIMÉRA VÍRUSOK SZERKESZTÉSE

 P7,5-gpt  
 selP-gp160



9.7 ábra

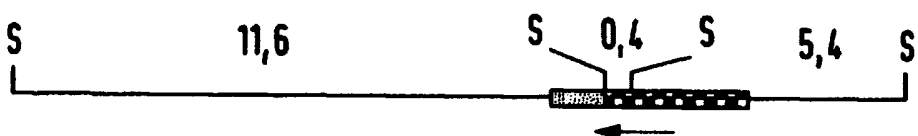
VAD TIPUSÚ Sal I-F FRAGMENS  P7,5 gpt  selP-gp160



Sal I FRAGMENS vsel P-gp160 MNA-BAN



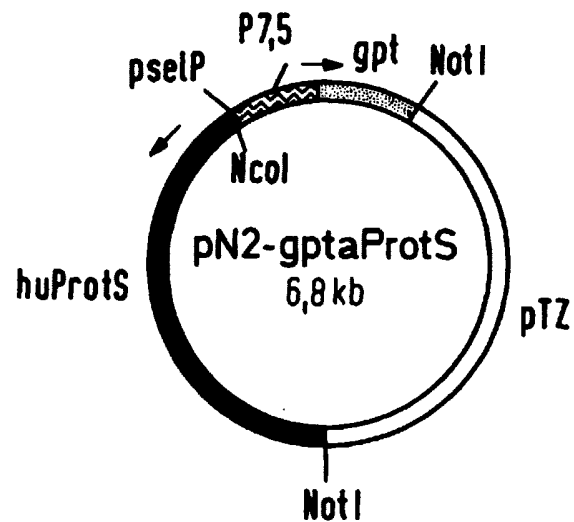
Sal I FRAGMENS vsel P-gp160 MNB-BEN



# 10.1 ábra

## pN2 - gpt α ProtS PLAZMID SZERKEZETE

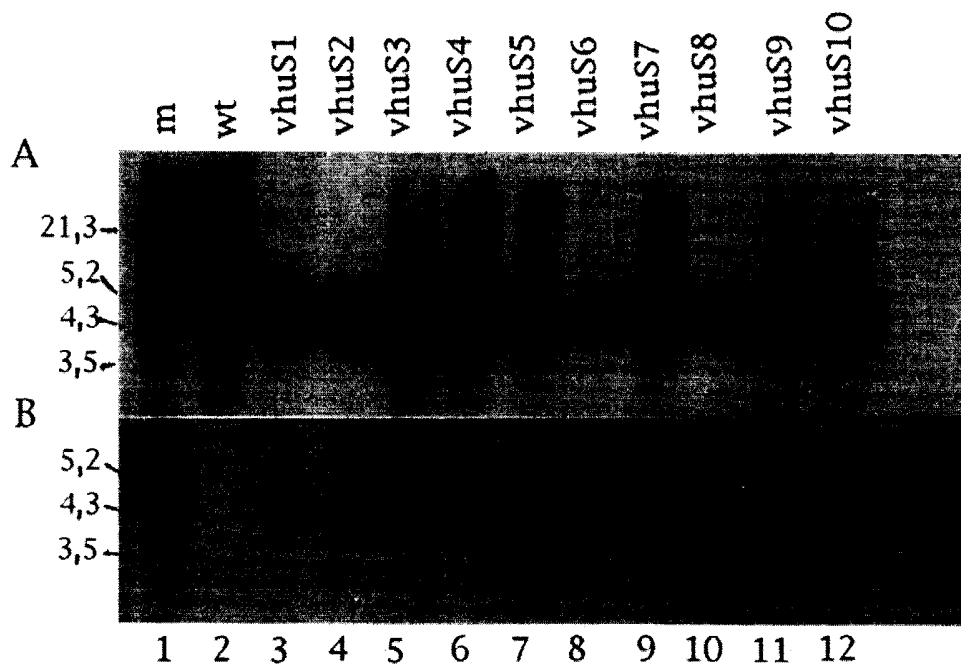
A)



B)

|                       |             |     |     |     |         |
|-----------------------|-------------|-----|-----|-----|---------|
|                       | met         | arg | val | leu | gly     |
| VAD TIPUSÚ S-PROTEIN: | GAA         | ATG | AGG | GTC | CTG GGT |
|                       | met         | ala | val | leu | gly     |
| S-PROTEIN A           | GCC         | ATG | GCG | GTC | CTG GGT |
| KIMÉRÁKBAN :          | <u>NcoI</u> |     |     |     |         |

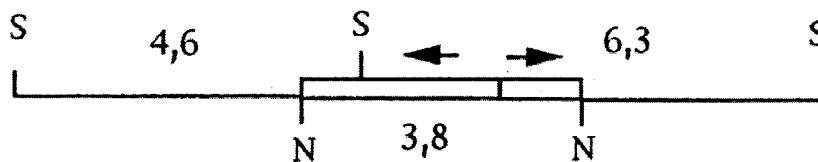
## 10.2 ábra



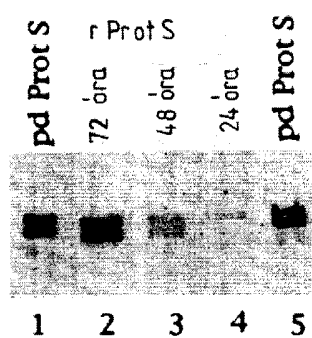
### C VAD TIPUSÚ VACCINIA VIRUS *Sac*I FRAGMENS



### MÓDOSÍTOTT *Sac*I FRAGMENS S-PROTEINT EXPRESSZÁLÓ VÍRUSOKBAN



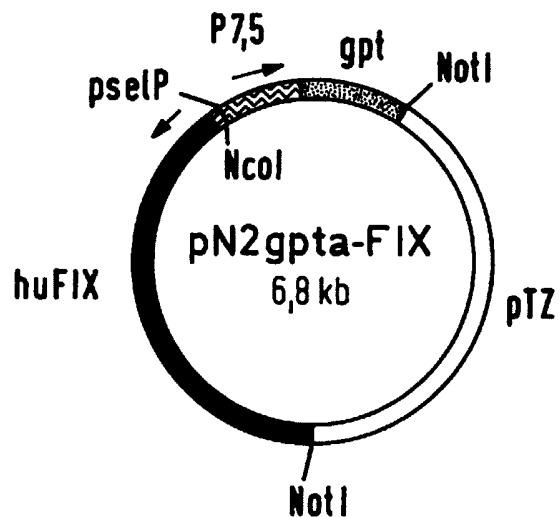
## 10.3 ábra



# 11.1 ábra

## pN2 gpta-FIX PLAZMID SZERKEZETE

A)



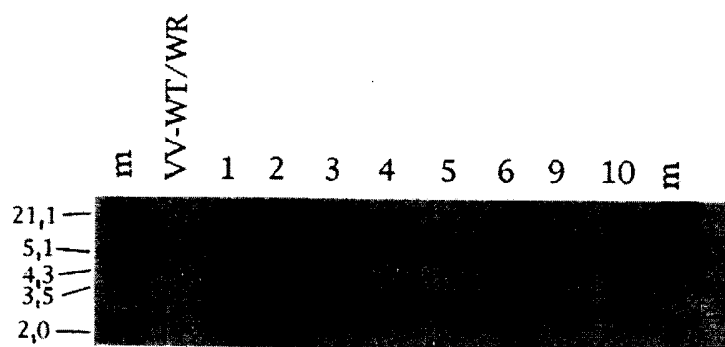
B)

|                        |                                               |
|------------------------|-----------------------------------------------|
| VAD TIPUSÚ IX FAKTOR : | met gln arg val asn<br>TT ATG CAG CGC GTG AAC |
| IX FAKTOR A            | met glu arg val asn                           |
| vFIXH5 BEN :           | <u>CC ATG GAG</u> CGC GTG AAC                 |

## 11.2 ábra

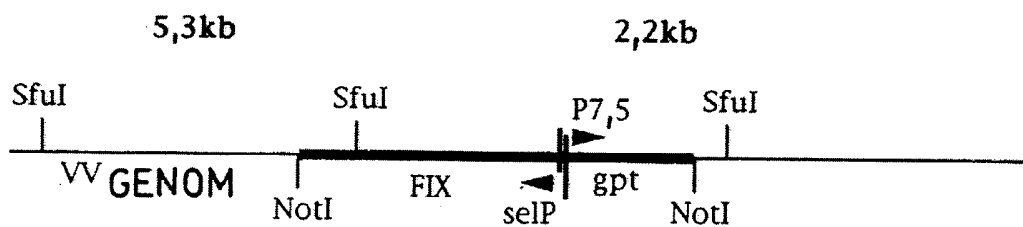
### IX FAKTORT EXPRESSZÁLÓ KIMÉRAK SOUTHERN BLOT ANALÍZISE

A

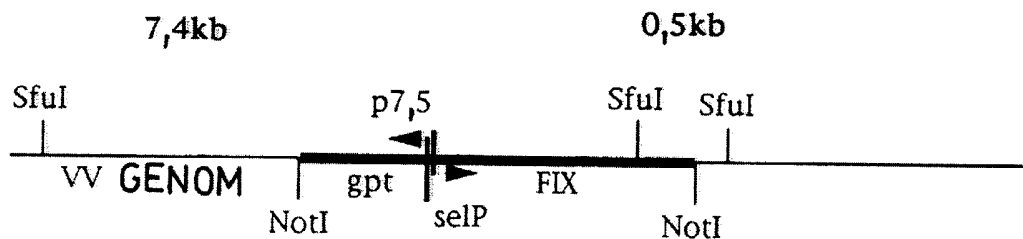


B

"a" ORIENTÁCIÓ

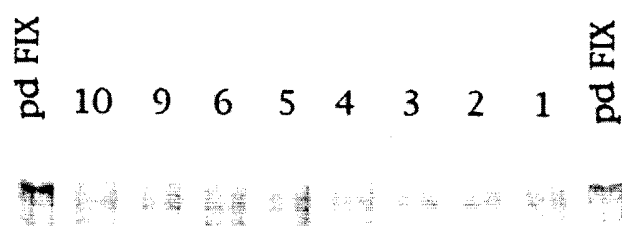


"b" ORIENTÁCIÓ



## 11.3 ábra

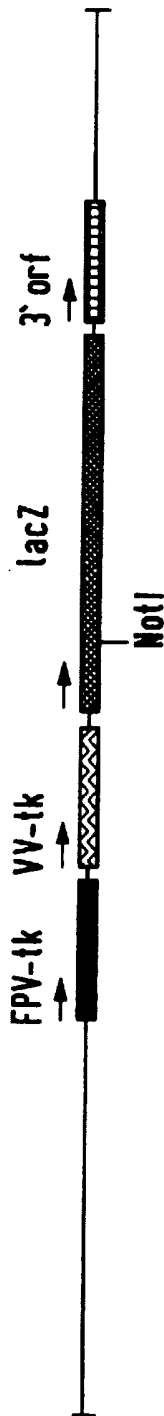
IX FAKTOR VERO SEJTEKBEN VALÓ EXPRESSZIÓJÁNAK  
WESTERN BLOT ANALÍZISE



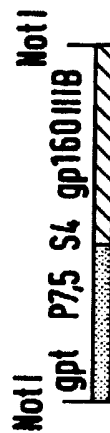
12.1 ábra

f-env III B KIMÉRA SZÁRNYAS POXVÍRUS (FPV) SZERKESZTÉSE KÖZVETLEN  
MOLEKULÁRIS KLÓNOZÁSSAL

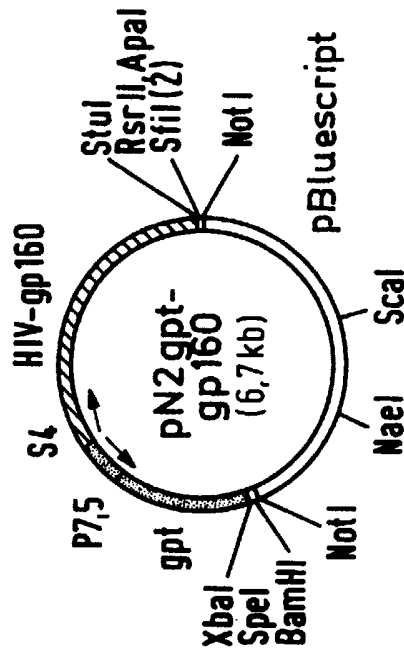
f-TK2a (300 kb) REKOMBINÁNS FPV



-f-TK2a EMÉSZTÉSE NotI-  
-GYEL  
-LIGALÁS NotI GÉN KA-  
ZETTÁVAL

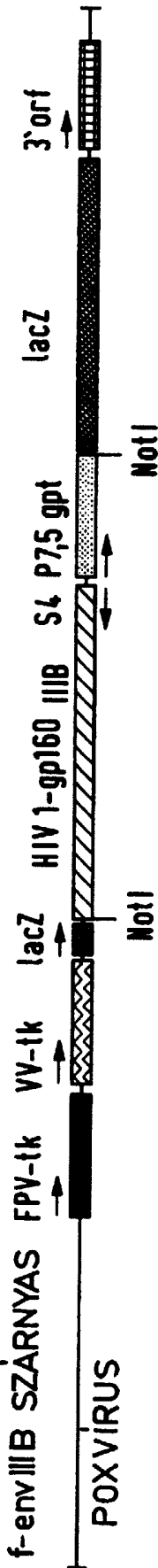


NotI GÉN  
KAZETTA  
ELŐÁLLÍTÁSA



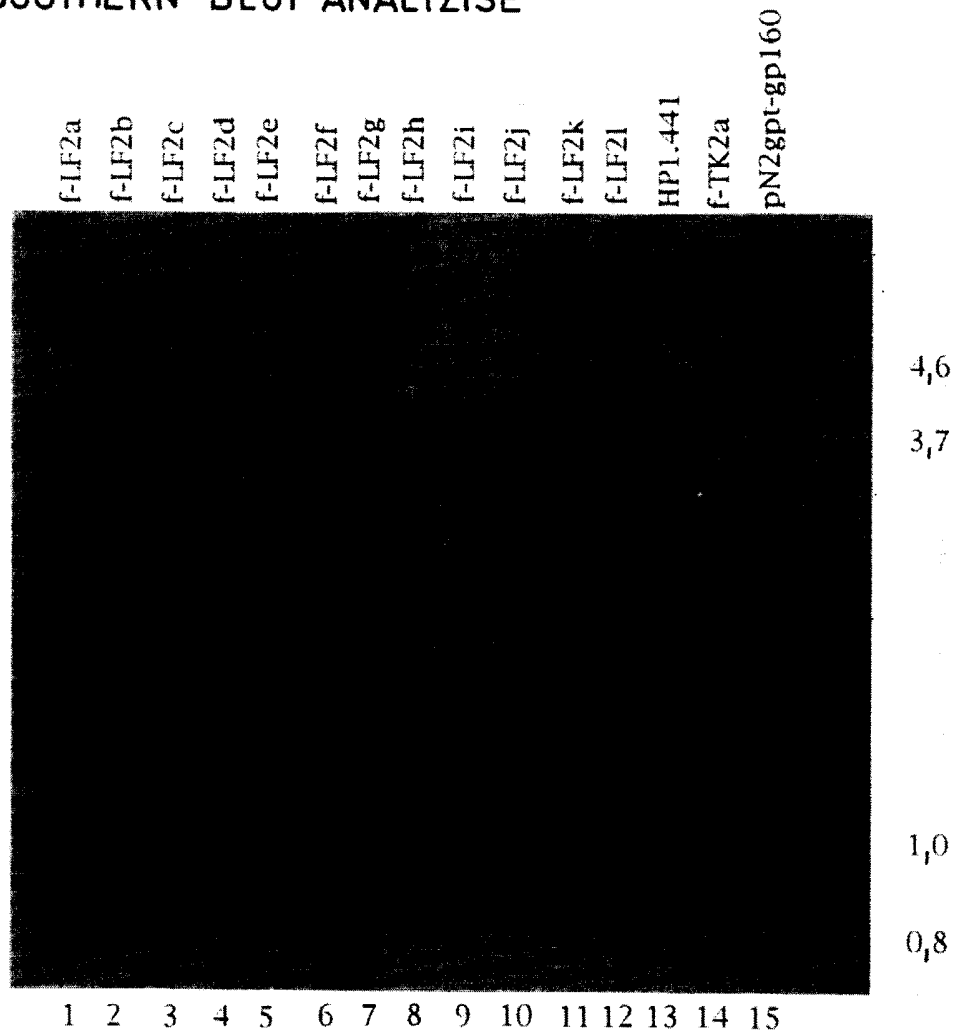
IN VITRO KLÓNOZOTT

f-env III B SZÁRNYAS



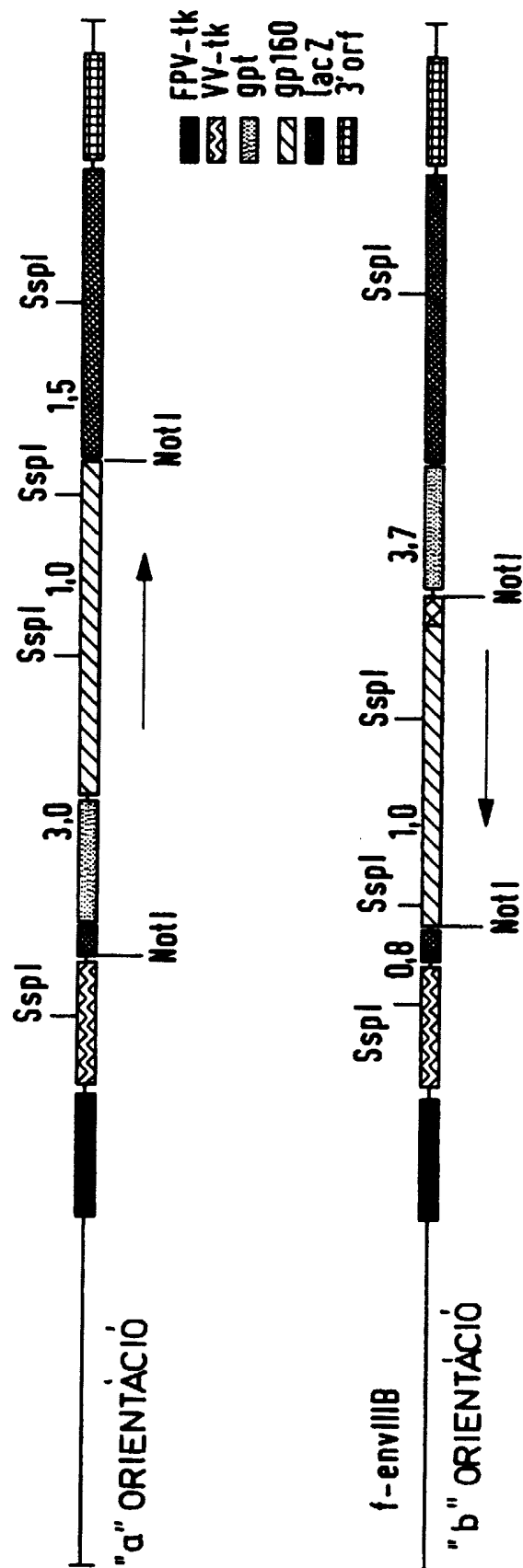
## 12.2A ábra

### IN VITRO KLÓNOZOTT SZÁRNYAS - POXVÍRUSOK SOUTHERN BLOT ANALÍZISE



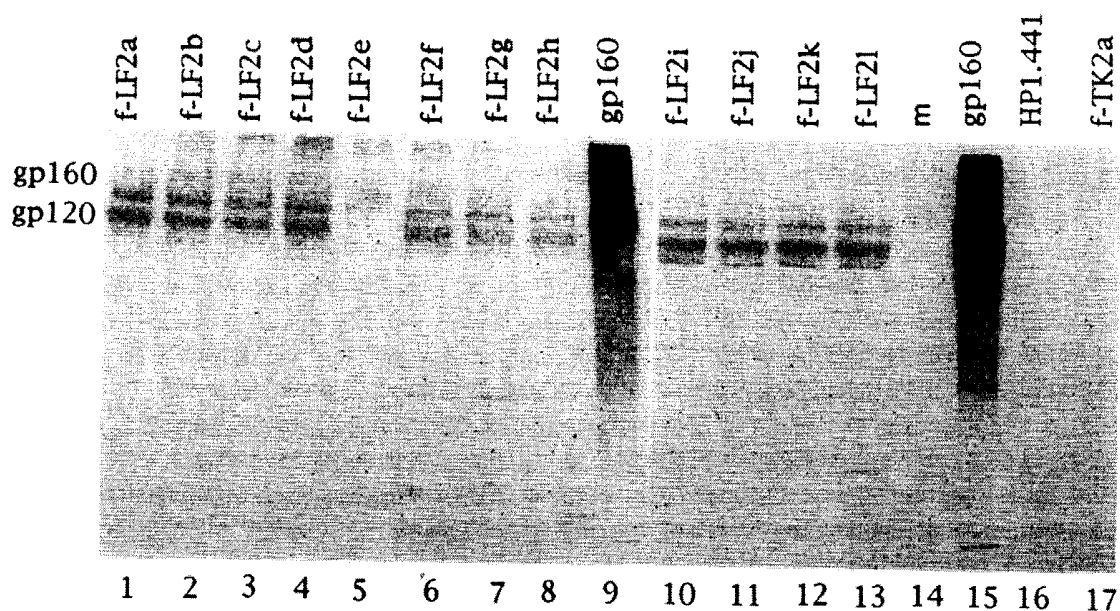
12.2B ábra  
KIMÉRA SZÁRNYAS-POXVÍRUSOK Sspl RESTRIKCIÓS FRAGMENTEINEK GÉNTÉRKÉPE

B)



## 12.3 ábra

WESTERN BLOT ANALÍZIS /gp160 EXPRESSZIÓ KIMÉRA,  
SZÁRNYAS-POXVÍRUSOKKAL FERTÖZÖTT CSIRKEEMBRIÓ  
FIBROBLASZTOKBAN



## 12.4 ábra

WESTERN BLOT ANALÍZIS/gp41 EXPRESSZIÓ KIMÉRA  
SZÁRNYAS-POXVÍRUSOKKAL FERTÖZÖTT CSIRKEEMBRIÓ  
FIBROBLASZTOKBAN

