

(19) HU

MAGYAR  
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)  
**197940 B**

(22) A bejelentés napja: 84.08.08.

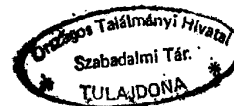
(21) 3033/84

(33) US:

(32) 83.08.09.

(31) 521.517

(51) Int.Cl.  
C 12 N 15/00  
C 12 P 21/00



(41) (42) A közzététel napja: 1985.05.28.

(45) Megjelent: 1990.02.26.

(72) Feltalálók:  
ROSENBERG Martin, Malvern, Pennsylvania,  
AUERBACH Jeffrey Ira, Silver Spring, Ma-  
ryland, US

(73) Szabadalmaz:  
Smithkline Beckman Corp., Philadelphia,  
Pennsylvania, US

## (54) ELJÁRÁS FEHÉRJE-TERMÉKEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA TRANSZFORMÁLT BAKTÉRIUMOK SEGÍTSÉGÉVEL

### (57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás valamely fe-  
hérje-termék baktérium-segítségével történő  
előállítására oly módon, hogy valamely bak-  
tériumtörzset olyan DNS fragmenssel transz-  
formálnak, amely a következő elemeket tar-  
talmazza:

- i) szelektálható marker,
- ii) olyan lambda profág DNS szekven-  
cia, amely egy hőmérsékletérzékeny cI represz-  
zor gént és funkcionális lizozim-kódoló gé-  
neket tartalmaz úgy, hogy a lizozim-kódo-  
ló gének permisszív hőmérsékleti körülmé-  
nyek között gátolva vannak, míg restriktív

hőmérsékleti körülmények között kifejeződ-  
nek, és funkcionális N, Q, S és R géneket  
is tartalmaz, és amelyből a kromoszómater-  
kép 3. és 71. helyei közötti, de legalább az  
58. és 71. helyei közötti gének delécioval ki-  
estek, és az O és P génekben történt mutá-  
ciók következtében az O és P gépfunkciókat  
elvesztette, és

iii) a fragmens és a gazdasejt kromoszó-  
mája között rekombinációt lehetővé tevő, a  
baktérium gazdasejt kromoszómájában köz-  
vetlenül szomszédos szekvenciával homológ,  
szomszédos DNS szekvenciák.

A találmány tárgya eljárás gensebesze-ti úton módosított mikroorganizmusok ter-mékeinek a mikroorganizmusból való kinye-résére.

A kívánt fehérjét előállító *E. coli* és más prokariota mikroorganizmusok gazdasejtként történő alkalmazásánál gyakori probléma az, hogy miként nyerjük ki a fehérjét a gaz-dasejtből tisztítás céljára. E problémát pél-dául úgy kísérelték meg megoldani, hogy a sejteket fizikai úton, homogenizálással vagy szonikus módszerrel vagy vegyi úton (felü-letaktív anyagok vagy lizozim enzim segít-ségével) roncsolták vagy egy, a jelentős pep-tid kiválasztását kódoló DNS szekvenciát kap-csoltak a kívánt termék előállítását kódoló szerkezeti génhez. Például Weissman és tár-sai (61 250. számú Európa szabadalmi be-jelentés) egy olyan eljárást ismertetnek, mely-ben a gazdasejteket sejtfal feloldó (lizáló) vagy permeabilitást okozó anyagokkal ke-zelik. Silhavy és társai (4 336 336. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) egy olyan eljárást ismertetnek, mely-ben egy citoplazma fehérjét kódoló gént egye-sítenek egy nem citoplazma fehérjét kódoló génnel úgy, hogy a fúzióval előállított gén olyan hibridet hozzon létre, amely a sejtfolyamatok révén a gazdasejt felszínéhez kö-zel kerül vagy a sejten kívülre jut. Gilbert és társai (4 338 393 számú amerikai egye-sült államokbeli szabadalmi leírás) egy olyan eljárást ismertetnek, mely során úgy állíta-nak elő érett, kiválasztott proteineket, hogy egy preproteín előállítását kódoló szerkezeti gént visznek egy kiválasztást biztosító vek-torba.

Az *E. coli* baktériumot meg lehet fertő-zni egy obligát parazitával, a lambda fággal, mely egy dupla szálú DNS vírus. A lambda fág genetikáját az *E. coli* genetikájához ha-sonlóan sokoldalúan tanulmányozták. Pél-dául „A lambda bakteriofág” című munka is ezzel foglalkozik (Cold Spring Harbor La-boratory, New York, 1971; kiadó A. P. Hershey).

A lambda fág, mely egy mérsékelten fer-tőző fág, az *E. coli* baktériumban két fázis-ban szaporodhat. Az egyik, azaz a litikus fá-zisban a fág DNS-e önállóan replikálódik és a kapszid fehérjék képződését, a védőbu-rok kialakulását és a gazdasejt lizisét irá-nyítja. A lambda fág DNS képződése a liti-kus fázisban nagyon hatékony. A DNS szá-lak képződése során a láncfelépülés mindkét láncon történik; az egyik láncon jobbolda-li irányban, a másik láncon baloldali irány-ban. Indukált folyamatban 37°C-on 50 perc leforgása alatt mintegy 100 fág fragmens szabadulhat fel. [Hershey: „A lambda bak-teriofág” (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1971)].

A másik, a lizogén fázisban a lambda fág DNS-e beépül a gazdasejt genomjába és pasz-szívan a gazdasejt kromoszóma DNS-ével együtt replikálódik a gazdasejt enzimjei ha-

tására. A lizogén szaporodási fázisban a fá-got profágnak nevezzük, a gazdasejtet lizo-génnek, és a faggal szemben immunisnak tekintjük.

A gazdasejt az immunitást elveszítheti olyan tényezők miatt, melyek litikus fázist indukálhatnak. A lambda fág int és xis gén-je katalizálja a lambda genom *E. coli* genom-jából történő delécióját, ezáltal egy kovalen-sen zárt kör keletkezik, mely önálló repliká-lódásra képes. E gének — és közvetett, vagy közvetlen módon a lambda fág valamennyi génje — szintézisét a lambda fág *ci* génje által termelt anyag elnyomja. Bizonyos vegy-szerek vagy DNS-t károsító anyagok hatá-sára a baktérium irányítja a bakteriális *recA* gén termékének szintézisét. A *recA* gén által termelt anyag proteolitikusan hasítja a *ci* represszor proteint, így lehetővé válik, hogy litikus fázisú gének kifejeződjenek. Ezt kö-vetően a fág szaporodásához néhány lamb-da szabályozó elem közötti kölcsönhatásra van szükség, mely végső soron azt eredmé-nyezi, hogy a lambda fág DNS-ének önálló replikálódása megkezdődik. A DNS repliká-lódásához a lambda fág *P* és *O* géneinek ter-mékére van szükség. A DNS replikálódását követően arra is szükség van, hogy a fág vi-rális szerkezeti fehérjék, azaz fej és farok pro-teinek szintézisét és azok érintetlen, üres vi-rionokba történő juttatását irányítsa. E mű-velethez legalább 18 gén kölcsönhatására van szükség. Végezetül a DNS beépül az üres viri-onba, így érintetlen, fertőzőképes virionok képződnek. A *Q* génje által termelt anyag aktíválja a lambda *S* és *R* géneket, melyek az endolizin enzimet kódolják. Az endolizin ha-tására a baktériumsejt felreped és a fágok kiszabadulnak. A *Q* gén működését az *N* funk-ció aktiválja. Az *N* gén működését viszont a *ci* gén működése elnyomja.

A kapszid burok képzéséhez szükséges 18 gén a jobb oldali átiró szálon a 3. és 36. hely között található, e helyek a teljes lambda DNS %-os értékeit jelölik. Balról jobbra az első gének: *A*, *W* és *B*, az utolsó pedig *J*. A nor-mál lizogénekben a *J* géntől jobbra 8 bakteriá-lis gén található. Ezek közül: a *bio A*, *B*, *C*, *D* és *F*, amelyek a biotin bioszintézisében vesz-nek részt. A hatodik, az *uvrB*, az ultraibolya sugárzással szembeni rezisztenciát viszi át. Az utolsó kettő, a *chlA* és *E* gén, a klorátok-kal szembeni érzékenységet viszi át. Erre vo-natkozó utalást találhatunk Guest munká-jában (Mol. Gen. Genet. 105, 285—289 (1969) és Stevens és társai „A lambda bakteriofág” (kiadó: Hershey, Cold Spring Harbor Labo-ratory, New York, 1971., 515—534. old.) cí-mű munkájában.

Egy másik lambda gén a *kil* gén, mely a természetes gazdasejt lizisfolyamatában vesz részt. A *kil* gén funkcióját ma még nem ismer-jük teljes egészében. A *kil* gént kifejező sejtek növekedési sebessége csökkent mértékű az indukálódást követően. A *kil* gén működése-

nek megszűnése esetén lehetővé válik, hogy a sejt normális ütemben növekedjen, azaz log fázisú növekedés az indukálódás után a lízis bekövetkezéséig. Az S és R génekhez hasonlóan a kil gén működését is a cl represszor szabályozza közvetett módon, az N génen keresztül. [Greer, *Virology* **66**, 589—604 (1975)].

A hőmérsékletre érzékeny lizogéneket már sokoldalúan tanulmányozták. Például Campbell is ismertette őket [*Virology* **14**, 22—32 (1961)]. A cl857 gén egy hőmérsékletre érzékeny cl mutáns. Csak 38°C-on vagy ez alatti hőmérsékleten működőképes. [E. Sussman és munkatársai *C. R. H. Acad. Sci. Paris* **254**, 1517—1519 (1962)]. Más fajoknál hasonló fág rendszerek ismeretesek. Például Lomovszkaja és társai [*J. Virol.* **9**, 258—262 (1972)] a *Streptomyces* baktériumot fertőző, mérsékelt fertőzőképességű fág hőmérsékletre érzékeny mutánsairól számolnak be; Flock [*Mol. Gen. Genet.* **155**, 241—247 (1977)] a *Bacillus* baktériumot fertőző, mérsékelt fertőzőképességű phi-105 fág hőmérséklettel szemben érzékeny mutánsairól tesz említést; Botstein és társai [*Nature* **251**, 584—588 (1974)] a *Salmonella* baktériumot mérsékelt fertőzőképességű P22 fág hőmérséklettel szemben érzékeny mutánsait ismerteti. Jostrom és társai [*J. Bacteriol.* **119**, 19—32 (1974)] és Thompson [*J. Bacteriol.* **129**, 778—788 (1977)] és a *Staphylococcus* baktériumot fertőző, mérsékelt fertőzőképességű phi-11 fág hőmérséklettel szemben érzékeny mutánsairól számolnak be; továbbá Miller és társai [*Virol.* **59**, 566—569 (1974)] a *Pseudomonas* baktérium hőmérséklettel szemben érzékeny fágjairól tesznek említést.

Botstein és társai [*Ann. Rev. Genetics* **16**, 61—83 (1982)] beszámolójából ismeretes, hogy a lambda fágot abszorbeálni képes *Salmonella* baktériumnál észleltek lambda endolizin enzim hatására bekövetkező lízist.

Perricaudet és társai [*FEBS Lett.* **56**, 7—11 (1975)] a lambda fág DNS lánc 58. és 71. helye közötti rész génjeinek deléciójáról ( $\Delta 58-71$ ) tesznek említést, mely szegmens magában foglalja a lambda int, xis, red, gam, cIII és a kil géneket.

Hershberger és társai a 2 084 584. számú európai szabadalmi bejelentésben eljárást ismertetnek, melyben egy plazmid stabilizálására és szelektálására gazdasejtként egy lizogén gazdasejtet alkalmaznak. Leírják például egy hiányos cl gént tartalmazó lizogén transzformálással egy funkcióképes cl gént hordozó plazmiddal. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a funkcióképes cl gén a cl857 gén.

Ismert, hogy az átvihető elemek, azaz olyan gének, melyek a gazdasejt kromoszóma rekombinációs mechanizmusától függetlenül tudnak rekombinálódni, jelölőként bevihetők a gazdasejtekbe. Ross és társai [*Cell* **16**, 721—731 (1979)] ismertetik a deléciók és

inverziók fizikai szerkezetét, melyeket a tn10 jelű átvihető, tetraciklinel szembeni rezisztenciát biztosító elemmel hoztak létre. Davis és társai a „Baktérium genetika” című munkájukban [Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1980)] átvihető elemek felhasználási módjait ismertetik.

Ruykun és társai [*Nature* **289**, 85—88 (1981)] az átvihető, kanamicinnel és neomicinnel szembeni rezisztenciát biztosító elem, a tn5 átvitelét ismertetik *Rhizobium* meliloti baktérium kromoszómájának DNS-ébe, a tn5 elemet hordozó plazmid konjugálásával, majd homológ rekombinációval. A 74 808. számú európai szabadalmi bejelentés heterológ gén integrálását ismerteti a homológ szomszédos szekvenciák jelenlétének eredményeképpen kialakuló rekombinációval.

A találmány tárgya eljárás baktériumokban termék előállítására mérsékelt fertőzőképességű fágokból származó endolizin-kódoló gének felhasználásával.

A találmány értelmében

a) egy hőmérsékletérzékeny baktériumtörzset, amely hőmérsékletérzékeny fág represszor gént és funkcionális lizozim-kódoló fág géneket úgy tartalmaz, hogy a lizozim-kódoló gének permisszív körülmények között gátolva vannak, és restriktív körülmények között kifejeződnek, egy DNS molekulával transzformálunk, amely a terméket direkt vagy indirekt módon kifejezi;

b) a transzformált törzset permisszív, a termék képződésének kedvező körülmények között tenyésztjük; majd

c) a hőmérséklet megemelésével restriktív körülményeket teremtünk, és

d) adott esetben a terméket a tenyészközegből vagy annak koncentrátumából kinyerjük.

A találmány másik tárgya olyan eljárás termék előállítására baktériumban, mely szerint

a) egy, a terméket előállító baktériumot egy olyan fág DNS szekvenciával transzformáljuk, amely egy hőmérséklet érzékeny fág represszor gént és lizozim-kódoló fág géneket hordoz, úgy, hogy a lizozim-kódoló gének permisszív körülmények között gátolva vannak, míg restriktív körülmények között kifejeződnek, ezáltal litikussá téve a baktériumot,

b) a transzformált baktériumot permisszív körülmények között úgy tenyésztjük, hogy termelődjön a kívánt termék, majd

c) a hőmérséklet emelésével restriktív körülményeket teremtünk, majd

d) adott esetben kinyerjük a terméket a tenyészközegből vagy annak koncentrátumából.

A találmány további tárgyát olyan DNS fragmens képezi, amely a következő elemekből áll:

a) egy defektív fág szekvencia, amely egy hőmérséklet érzékeny represszor gént és funk-

5

cionális lizozim-kódoló géneket tartalmaz úgy, hogy a lizozim-kódoló gének permisszív körülmények között gátolva vannak, míg restriktív körülmények között kifejeződnek;

b) egy, a többi közül kiválasztható marker; valamint

c) egymással szomszédos szekvenciák, amelyek a gazdasejt kromoszómájában lévő szomszédos szekvenciával homológok.

A találmány tárgyát képezi litikus baktérium előállítás módja is, mely szerint egy baktériumot a találmány szerinti DNS fragmenssel transzformálunk.

A találmány szerinti eljárással előállított termékkel emlősök kezelhetők oly módon, hogy a termék hatékony dózisát tartalmazó hőmérsékletérzékeny baktériumot adunk az emlősöknek és a baktérium fala az emlős belsejében bomlik fel, és a termék ott szabadul ki.

A hőmérséklettel szemben érzékeny baktériumok olyan profág DNS szekvenciát hordoznak, mely egy hőmérséklettel szemben érzékeny represszor gént tartalmaz úgy, hogy ha a baktériumot egy bizonyos hőmérsékleti tartományban (permisszív körülmények között) tenyésztjük, a represszor működik, azonban ha egy másik hőmérsékleti tartományban (restriktív körülmények között) tenyésztjük, a represszor nem működik; vagyis a represszor nem fejeződik ki vagy nem stabil. Restriktív körülmények között a fág gének — beleértve a fág lizozim géneket is — kifejeződnek, ami a gazdasejt falának lebomlását (lízisét) idézi elő. Az ilyen hőmérséklettel szemben érzékeny baktériumok litikus baktériumok. A fentiek szerint definiált bármely litikus baktérium felhasználható a találmány szerinti eljárásban.

Hőmérséklettel szemben érzékeny, mérsékelt fertőzőképességű fág represszor gének hozzáférhetők, vagy ilyen gének már ismert eljárással történő mutációjával előállíthatók. Például Campbell [Virology 14, 22—32 (1961)] ismertet egy eljárást a hőmérséklettel szemben érzékeny fág mutánsok izolálására. Az eljárás általában a következő:

a) a fággal fertőzött baktériumot mutagenézissel vetjük alá — például ultrabolya besugárzással —; majd

b) a túlélő baktériumokat magas hőmérsékleten inkubáljuk, hogy hőmérséklet érzékeny represszor mutánsok képződését inkubáljuk;

c) ezeknek lizátumával érzékeny baktériumokat fertőzünk meg;

d) az új lizogén baktériumokat hőhatással indukáljuk és a hőindukció után keletkező fágokat használjuk az érzékeny baktériumokból történő lizogén fágok előállítására.

Ezzel a ciklussal (lizogén előállítás, indukció, ismételt előállítás) fág represszor mutánsok hozhatók létre. Általában 3—4 ilyen ciklus elegendő ahhoz, hogy ilyen mutánsokat kapjunk.

A következőkben a leírás elsősorban litikus *E. coli* baktériumra — elsősorban c1857 *E.*

4

6

*coli* lizogén baktériumokra — vonatkozik. Azonban a leírás alapján bármely, az adott területen átlagos jártassággal rendelkező szakember képes bármely más litikus *E. coli* vagy más litikus baktériumot előállítani a lambda fágól vagy más mérsékelt fertőzőképességű fágól — mint például a fent említett mérsékelt fertőzőképességű fágokból — származó represszor gén és endolizin enzimet kódoló gének alkalmazásával.

A c1857 lizogén baktérium törzsek — melyek ismertek és könnyen hozzáférhetők — olyan c1 represszort termelnek, mely aktív 38°C-on vagy ez alatt, azonban 38°C felett inaktív. E baktériumok előnyösebbek, mint a többi hőmérséklet érzékeny *E. coli* lizogén törzs, mivel amellett, hogy olyan mutációt tartalmaz, mely a represszort 38°C felett inaktívvá teszi, a c1857 gén tartalmaz egy másik mutáns is, mely a c1 represszor proteint érzéketlenné teszi a lambda recA gén termékével történő proteolitikus bontással szemben. Így, ha permisszív körülmények között tenyésztjük, a c1 represszor protein stabil és ennélfogva hatékony az immunitás fenntartásában.

Az UC5822 *E. coli* törzs egy olyan lizogén baktériumtörzs, mely a c1857 gén mutációt tartalmazza. Emellett egy pontmutációt is tartalmaz az int génben (int 6 am, egy amber mutáció) és a P génben (P3 am, egy amber mutáció). (A transláció végét az amber mutációk jelzik). Az UC5822 törzset általában előnyben részesítik például az MM294 (c1857) törzsszel szemben, mivel hibás, azaz általában nem termel fertőzőképes fág részeket. A hibás lizogén baktériumokat szívesebben alkalmazzák, különösen akkor, ha polipeptideket emlősökbe juttatnak be. Az UC5822 törzs azonban kevesebb lizozim enzimet termel, feltehetően azért, mert kevesebb számú S és R génmásolatot tartalmaz, mint az MM294 (c1857) törzs, azaz az indukció befejezése után 50—100-szor kevesebbet. Ennek ellenére az UC5822 baktérium törzs esetén is az indukció után a lízis közvetlenül bekövetkezik.

A találmány szerinti eljárás értelmében a hőmérséklettel szemben érzékeny baktériumot olyan DNS molekulával (molekulákkal) transzformáljuk, mely közvetlenül vagy közvetett úton a kívánt termék előállítását kódolja. A transzformáció történhet bármely olyan eljárással, mely lehetővé teszi, hogy a DNS molekula bejusson a gazdasejtbe és ott a termék kifejeződjék. A DNS molekula bevitelle történhet például transzformációval, transzdukciónal, konjugációnal és sejtfúzióval. Erre a célra alkalmas sokféle expreziós vektor, valamint gének klónozására és sejtek transzformálására alkalmas eljárások jól ismertek és hozzáférhetők. A kapott termék általában egy ki nem választott heterológ (nem homológ) géntermék, azaz egy olyan termék, melyet a gazdasejt természetes körülmények között nem állít elő és nem választ ki. A

közvetlen módon előállított termékek lehetnek például polipeptidek; a közvetett módon előállított termékek pedig például polipeptidek, glikoproteinek, antibiotikumok és más molekulák lehetnek, mint például fémionok, amelyek metallotioneint előállító baktériumokban termelődhetnek.

A transzformált cI857 lizogén baktériumok tetszés szerint tenyésztethetők permisszív, a kívánt termék előállítása szempontjából optimális körülmények között (azaz  $\leq 38^\circ\text{C}$ , előnyösen  $32\text{--}36^\circ\text{C}$  között). Amikor elérjük a megfelelő növekedést, azaz rendszerint a logaritmus növekedési fázis közepén (azaz, ha  $A_{650}=0,5$ ), akkor a lambda endolizin enzim szintézisét indukáljuk úgy, hogy a lizogén baktériumot restriktív körülmények között tenyésztjük. Ezt úgy érhetjük el, hogy a tápközeg vagy koncentrátuma hőmérsékletét emeljük — például a cI857 baktérium törzs esetén  $38^\circ\text{C}$  fölé, előnyösen  $42\text{--}44^\circ\text{C}$  közé — körülbelül  $90\text{--}120$  percig. Más módon úgy is eljáráhatunk, hogy a tápközeg, illetve koncentrátuma hőmérsékletét  $38^\circ\text{C}$  fölé, előnyösen  $42\text{--}44^\circ\text{C}$  közé emeljük rövidebb időtartamra — előnyösen legalább  $5$  percre — vagyis annyi ideig, mely elegendő ahhoz, hogy a fág DNS-ét indukálja, majd ezt követően a hőmérsékletet csökkentjük  $0\text{--}38^\circ\text{C}$ -ra, előnyösen  $2\text{--}36^\circ\text{C}$ -ra.

A restriktív körülményeket célszerűbb  $90\text{--}120$  percig fenntartani, mert így a lízis hatékonyabb és gyorsabb. Azonban a rövidebb ideig tartó (második) eljárás egyes esetekben — például amikor a végtermék hőre érzékeny fehérje vagy a restriktív körülmények fenntartásának költsége túl magas — mégis előnyösebb lehet.

Ha cI857 lizogén gazdasejt tartalmaz egy funkcióképes lambda cro gént, akkor a sejt bármely, a gazdasejt működéséhez megfelelő hőmérsékleten folytatja a lizozim enzim szintézisét, mindaddig, ameddig a lízis be nem következik. Bár a lambda endolizin még  $0^\circ\text{C}$ -on is aktív, a lízishez szükséges idő alacsony hőmérsékleten nagyobb, mivel a fehérjeszintézis sebessége kisebb és általában a katalitikus aktivitás csökken.

Előnyös, ha az indukció előtt vagy közvetlenül az indukció után koncentrálnak a baktériumsejteket — szűrővel, centrifugálással vagy más módon — és a baktériumokat a lízisig ebben a koncentrált állapotban inkubáljuk. Az ilyen eljárás a kívánt végtermék összegyűjtését és tisztítását segíti elő. Az inkubáció után a baktérium sejtfala lényegében lebomlik. A sejtek protoplaszt formában továbbra is szintetizálják a kívánt terméket, és a termék zöme a sejtmembránon keresztül a tápközegbe jut. A kívánt termékek teljes mennyiségének a baktériumból való kijutását lízissel érhetjük el. A lízis folyamatát a tápközeg vagy ennek koncentrátuma kitisztulása és/vagy ezek viszkozitásának növekedése mutatja. A lízis folyamatát elősegíthetjük például mechanikus úton ke-

veréssel vagy a tenyészkörülmények gyors változtatásával, mint például a hőmérséklet gyors változtatásával  $2$  és  $25^\circ\text{C}$  között vagy a tápközeg, illetve a koncentrátum ozmózis nyomásának a változtatásával. A sejtek koncentrációja és a terméket tartalmazó felülúszó dekantálása után az indukált sejteket előnyösen minimál puffer sóoldatban vagy  $0,1$  mól/l tris puffert,  $50$  millimól/l NaCl-t és  $1$  millimól/l EDTA-t tartalmazó oldatban szuszpendáljuk és keverjük.

A kívánt terméket a tápközegből, illetve a koncentrátumból ismert módszerekkel nyerhetjük ki, vagy ha szükség van rá, tisztíthatjuk.

Alternatív módszer a kívánt termék előállítására, hogy az egészben lévő baktériumsejteket koncentrálnak és a lizikus fázis indukálása előtt szájon át juttatjuk be az emlősök szervezetébe. Az indukció így az emlősök szervezetén belül megy végbe, így ott szabadul fel a kívánt polipeptid. Ez a módszer különösen az antigének állatok szervezetébe történő bejuttatásának olyan eseteiben hasznos, ha előnyös, hogy az egész baktériumsejtek és a kívánt antigén védő immunreakciót váltson ki. Így például antigének, mint például az LT-B antigén, termelését kódoló géneket hordozó hőmérséklet érzékeny lizogének közvetlenül szájon át bevihetők malacokba és/vagy borjakba. Az egyes állatokba bejuttatandó sejtek mennyisége annyi, amennyi a hatásos dózist biztosítja. Az egységnyi mennyiségű sejt által termelt protein mennyisége ismert módszerekkel kiszámítható.

A találmány szerinti eljárás kiterjed egy DNS fragmens előállítására is, mely a lizikus baktérium fenti kialakításában használható. Egy ilyen DNS fragmens egy hőmérséklettel szemben érzékeny represszor gént és működő lizozim kódoló géneket tartalmazó hibás fág szekvenciát tartalmaz. Az ilyen hibás lambda fág szekvenciát tartalmazó DNS fragmens olyan hőmérsékletre érzékeny cI gént, valamint működő lambda endolizin termelést kódoló géneket (N, Q, S és R gének) tartalmaz, hogy az endolizin restriktív körülmények között fejeződik ki, továbbá van egy szelektálásra alkalmas jelölője és előnyösen rendelkezik olyan szomszédos DNS szekvenciával, mely homológ a gazdasejt kromoszómájának szomszédos DNS szekvenciájával.

Egy speciális esetben a DNS fragmens egy olyan lambda DNS-t tartalmaz, melyben a kromoszómatérkép  $58.$  és  $71.$  helye közötti gének deléciónal kiestek, így hiányzik az int, xis és a kil gén;

van egy hőmérsékletre érzékeny cI génje;

mutációkkal rendelkezik az O és a P génekben;

a cI gén megfelel a cI857 mutánsnak és endolizint termel restriktív körülmények kö-

zött. Az O és a P mutációk lehetnek delécióval létrejött mutációk vagy pontmutációk. A pontmutációk — mint például a O29, P3 és a P80 mutációk — előnyösebbek, mivel könnyebben hozzáférhetők. A P3 mutáció előnyösebb, mint a p80 mutáció.

Egy másik speciális esetben a fragmens olyan lambda DNS-t tartalmaz, mely lényegében delécióval elveszítette a kromoszómaterkép 3. és 71. helye közötti génjeit. Az ilyen DNS fragmensből lényegében véve hiányzik minden gén, mely fontos a lambda fág kapszidburkának a létrehozásában, továbbá hiányzik belőle az int, xis és kil gén is.

Az *E. coli* vagy más egyéb baktériumsejt, mely elő tudja állítani a kívánt terméket, vagy amelyet már korábban vagy a későbbiek során — például génmanipuláció révén — képessé tettünk a termék előállítására, ismert módon transzformálható olyan fág DNS szekvenciával, amely egy hőmérsékletre érzékeny fág represszor gént és a fág lizozim enzim termelését kódoló géneket hordoz. Ilyen eljárás például a baktérium megfertőzése egy olyan mérsékelt fertőzőképességű faggal — előnyösen hibás faggal —, mely tartalmaz ilyen hőmérséklettel szemben érzékeny represszor gént. Továbbá ilyen eljárás a baktérium ismert módon történő transzformálása a találmány szerinti DNS fragmenssel például transzformálás, transzdukció, konjugáció vagy fúzió útján. A transzformáció általában magában foglalja a fragmens bevitelét egy vektorba, például fágba vagy plazmidba. Például a fragmenst klónozással bevihetjük egy plazmidba (például a pBR322 vagy más plazmidba) és in vivo szaporíthatjuk egy olyan megfelelő gazdasejtben, melyből hiányzik a fragmenssel szomszédos szekvenciáknak megfelelő homológ szomszédos szekvencia vagy amelynek rekombinációs elemei hiányosak ( $rec^-$ ). A plazmidot kinyerhetjük és alkalmas gazdasejtet transzformálhatunk vele a termék előállítása céljából. Az ilyen gazdasejt a transzformálást követően az olyan fragmens, mely a gazdasejt kromoszómájában lévő szomszédos DNS szekvenciával homológ szomszédos DNS szekvenciával rendelkezik, spontán rekombináció útján beépül a homológ szomszédos szekvencia helyére. Más módon úgy is járhatunk, hogy a kívánt termék szempontjából megfelelő gazdasejtet transzformáljuk a lineáris vagy ciklikus formában izolált DNS fragmenssel.

A DNS fragmens egy szelekciós markert is tartalmaz, mely segít abban, hogy kiválaszthassuk a transzformánsokat. A szelekciót lehetővé tevő markerek olyan gének, melyek kimutatható enzimek termelését kódolják, amelyek az auxotróf gazdasejt prototrófiáját helyreállítják vagy rezisztenssé teszik a baktériumot letális vagy gátló vegyületekkel — rendszerint antibiotikumokkal — szemben. Előnyös, ha a szelekciós marker egy olyan gén, mely antibiotikummal szembeni rezisztenciát biztosít, mert ehhez nem

szükséges auxotróf gazdasejt, amely esetleg nem áll rendelkezésre vagy amely spontán módon visszaalakulhat prototróffá. Előnyös a tetraciklinnel szembeni rezisztencia, mert a tetraciklin olcsó és a vele szembeni rezisztencia normális körülmények között spontán módon nem alakul ki.

A transzformálásban jelen lévő szelekciós marker jelzi, hogy a gazdasejt tartalmazza a DNS fragmenst. A DNS fragmens beépülése esetén az egész fragmens beépül, mivel a DNS fragmens és a gazdasejt DNS-e közötti homológia csak a lambda DNS és a markerrel szomszédos tartományban áll fenn.

Ha a DNS fragmensben nincs marker, akkor a lambda DNS-t hordozó gazdasejt transzdukció utáni szelekciója vagy más transzformáló eljárás további eljárást igényel, amelynek során a feltételezhetően transzdukált sejteket meg kell fertőzni (szuperinfekció) egy hibás faggal (mely nem integrálódik), és az immunis túlélő baktériumokat ki kell választani.

A találmány szerinti DNS fragmens integrálása révén litikussá tett *E. coli* törzsként például MG törzseket használhatunk. E törzsek olyan lizogének, melyekből a kromoszómaterkép 58. és 71. helye közötti lambda fág DNS rész delécióval kiesett, ennél fogva hiányzik az int, xis, red, gam, kil és  $ciI^+$  gén; rendelkezik  $cl857$  mutációval; van O és P gén mutációja; működő N, Q, S és R génjei vannak, melyek révén restriktív körülmények között történik az endolizin kifejezése.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint, az MG1 baktérium törzsnél [ $C600$  ( $\lambda\Delta58-71$ ,  $cl857$ , P3, O29,  $SuII^+$ ,  $galK$ ,  $lacZ$ ,  $thi$ ,  $gal::tn10$   $tet^R$ ), a pontmutáció (amber mutáció) végigolvasódik, és az O és P gének kifejeződnek, mivel a gazdasejt DNS-e egy amber szupresszort termel, vagyis az UAG translációs terminációs kódon translációs szupresszorát.

A találmány szerinti eljárásban előnyösebben használható fel az a gazdasejt, mely fenotípus szempontjából  $O^-$  és  $P^-$  (azaz ezeket a géneket nem tartalmazza). A találmány egyik megvalósítási módja szerint az MG3 baktériumtörzs [ $N99$  ( $\lambda\Delta58-71$ ,  $cl857$ , P3, O29)  $galK$ ,  $lacZ$ ,  $thi$ ,  $gal::tn10$   $tet^R$ ] ugyanazt a lambda DNS fragmenst hordozza, mint az MG1 törzs. Azonban fenotípusát tekintve  $O^-$  és  $P^-$ , valamint  $tet^R$ ,  $\Delta kil$ ,  $\Delta int$  és  $\Delta xis$ .

A legelőnyösebb litikus *E. coli* törzsek az MG4 törzsek. Ezek olyan törzsek, amelyekből delécióval lényegében kiesett a lambda fág valamennyi szerkezeti protein- és felépítő-gén és a megfelelő profág-baktérium kapcsolódási pont, azaz a megfelelő illeszkedési pont ( $att^R$ ) kódolása. Tehát ezek a törzsek olyan lizogén baktérium törzsek, melyek delécióval elvesztették lényegében véve valamennyi, a kromoszómaterkép 3. és 71. helye között elhelyezkedő lambda génjüket;

— az O és P géneknél pontmutációt tartalmaznak;

- egy hőmérsékletre érzékeny cI génnel rendelkeznek;
- működő N, Q, S és R génjeik vannak, melyek restriktív körülmények között fejezik ki az endolizint; valamint
- szelektációs markert tartalmaznak, nevezetesen a tn10 tetraciklinnel szembeni rezisztenciát átvivő elemet.

Az ilyen hibás lizogének 4 egymástól független csoportot alkotnak a vírus (fág) szaporítása szempontjából:

- i) hiányzik a O és P replikáló funkció;
- ii) hiányzik az att<sup>x</sup>, mely miatt lehetlenné válik a profág számára, hogy egy felülfertőző fágból int és xis génekkel egészüljön ki;

iii) nem képes arra, hogy a lambda szerkezeti géneket kódolja; valamint

iv) a lambda DNS mérete messze a védőburok képzéséhez szükséges minimális méret alatt marad.

Ilyen hibás lizogéneket először úgy állíthatunk elő, hogy cI857, O<sup>-</sup>, P<sup>8</sup> lizogén törzseket — mint például az MG törzseket — kloráttal kezeljük, hogy kloráttal szemben rezisztens mutánsokat kapjunk, majd az ilyen mutánsok közül kiválasztjuk azokat, melyek nem képesek kiegészülni a felülfertőző heteroimmunus vagy virulens lambda faggal vagy az A és B funkcióban hiányos lambdoid faggal történő szaporítás során. A markert tartalmazó DNS fragmenst, a lambda DNS-t és az E. coli kromoszómájából származó szomszédos szekvenciát izolálhatjuk az MG4 törzstől restriktációs endonukleáz enzimes kezeléssel vagy P1 transzdukcióval.

Az MG4 baktérium törzset az MG3 törzsből származtathatjuk úgy, hogy delécióval eltávolítjuk az összes bakteriofág gént — vagy legalább is azok nagy részét —, melyek a vírus szerkezeti komponenseket kódolják. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy ezek a gének kiestek, elegendő kimutatni, hogy az MG4-ben a vírus (fág) genom képtelen arra, hogy az e géneket nem tartalmazó felülfertőző fagot kiegészítse és szaporítsa. A  $\lambda$  charon 3A ( $\lambda$  A<sup>-</sup>, R<sup>-</sup> immØ80) egy olyan fág, mely alkalmas erre a felülfertőzésre. Ugyanúgy bármely olyan fág, mely az A, B vagy más szerkezeti cisztronjában amber mutációt hordoz, kimutatható az érzékeny E. coli baktériumon egy heteroimmunus vagy virulens fág (lambda vírus) jelenlétében. A két fág között rekombináció lép fel és egy rekombináns, például virA<sup>-</sup> keletkezik. A kísérlet körülményeitől függően a rekombináció gyakorisága 1—50% között lesz. A rekombináns fágokat felismerhetjük arról, hogy a szupresszort tartalmazó lizogén baktériumokon [Y mel( $\lambda$ )] tenyésztethetők, és hogy a szupresszort nem tartalmazó lambda érzékeny baktérium törzseken — mint például az N99 törzsen — nem képesek plakkokat létrehozni. A fenti keresztezéssel kapott plakkokat Y mel( $\lambda$ ) vagy N99 törzset

tartalmazó Petri-csészékben tenyésztjük, és a rekombinánsokat tisztítjuk. Előnyösen A és/vagy B gén funkció hiányos lambda fágokat használunk, mivel az MG4 lambda genom nem képes a fenti működés helyettesítésére, az összes többi lambda szerkezeti génjük is hiányos. A hibás fágok és gazdaszövetek ehhez hasonló alkalmazási módja, amelyet „marker mentés”-ként említenek, széles körben elterjedt, erre találunk példát a Hershey által kiadott „The Bacteriophage Lambda” c. munkájában (Cold Spring Harbor Laboratory, 1971. — elsősorban Stevens és társai által írt részben. 515—553. old.).

A találmány szerint bármely baktérium-termék előállítható. Példaként említhetjük, többek között az inzulint, vesztettség elleni glikoproteint, K99 987P antigént, antibiotikumokat, növekedésszabályozó hormonokat, metallothioneint,  $\alpha$ -1-antitripsint, influenza elleni antigéneket, limfokineket és interferont. Emellett a találmány alkalmazható baktérium kolóniák átvizsgálására, RNS izolálására és plazmid előállítására, mivel a találmány az egyébként szükséges lízis folyamatának a mellőzésével nagymértékben egyszerűíti ezeket az eljárásokat és lerövidíti az eljárások lefolytatásához szükséges időt.

A találmányt az alábbi példákkal illusztráljuk, anélkül, hogy a találmányt a példákra korlátoznánk.

Az alábbi példákban szereplő kiindulási anyagok könnyen hozzáférhetők vagy ismert eljárásokkal könnyen előállíthatók.

E. coli C600: ATCC 23724

E. coli N99: ATCC 33956

E. coli MM 294: ATCC 33925

40 E. coli N5151: a Gottesman és munkatársai által a J. Mol. Biol. 140, 57—75 (1980) helyen ismertetett SA500 törzsből vezethető le, amelyet cI857 hőmérsékletérzékeny  $\lambda$  represszort hordozó  $\lambda$  faggal fertőzünk. Ez a gén a pRK248cIs plazmidban, a JMB9 törzsből (ATCC 33766) hozzáférhető. Az SA500/ $\lambda$  lizogén előállítható az A. D. Hershey, The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1971 vagy a Maniatis, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982. helyen ismertetett módon.

50 E. coli AR4: az N4903 törzs (Gottesman id. h.)  $\lambda$ -érzékeny rekombinánsa, amelyet Plcm100 segítő faggal fertőzünk. A Plcm100 egy transzdukáló fág, szokásosan alkalmazott eszköz baktérium DNS egyik sejtből a másikba történő átvitelére (I. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972). A Plcm100 a P1 transzdukáló fágból vezethető le, amely az ATCC 25404-B1 számon hozzáférhető, meg van említve Hershey idézett helyen és Glass, Gene Function E. coli and its Heritable Elements, University of California Press, Los Angeles, 1982. helyen.

Fágok genetikai manipulációjára számos módszer ismeretes, így például Hendrix és munkatársai, Lambda II, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, vagy Hershey Miller, Maniatis vagy Glass idézett művei.

A  $\lambda$  fág mutációk szintén ismert módszerekkel végezhetők, így a következőkkel:

- $\lambda$ c1857 — Sussman, C.R.H. Acad. Sci., Paris, 254, 517—19 (1962);  
P3; 029; P80 — Campbell, Virology, 14, 22—32 (1966);  
int6; red3 — Signer, J. Mol. Biol. 32, 261 (1968);  
hy5;  $\Delta$ b2 — Gottesman, J. Mol. Biol. 31, 487—505 (1968); és Liedke—Kulke, Virology, 32, 465 (1967);  
imm21 — Herskowitz, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 355 (1970).

21 fág: egy, a  $\lambda$  fággal rokon lambdoid-szerű bakteriofág (l. Hendrix, id. h.) a korábban  $\lambda$ fággal fertőzött sejtek fertőzésére használható. Emellett a  $\lambda$ /21 hibridek (l. Gottesman és Liedke—Kulke id. h.) olyan sejtek felülfertőzésére használhatók, amelyek a  $\lambda$ fág fertőzéssel szemben immunissá válnak.

pDN5 plazmid: a pBR322 származéka, 4 tandem lac promotort tartalmaz, amelyek operatíven kapcsolódnak az LT gén B alegységéhez (l. Miller, Vaccine 85: CSH Molecular Approaches to Vaccines, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1985).

pESS2 plazmid: az LT gén B alegységét pDM101-be klónozva tartalmazza, amely egy másik pBR322 származék, amely tartalmazza a par helyet. (Meacock, Cell, 20, 529—42 (1980)). A klónozás előtt az LT gént izoláljuk és szubklónozzuk a pBR322 BamHI helyére, így előállítva az RSF2124 plazmidot (l. So és munkatársai, Infect. Immun., 21, 405—411 (1978)).

A találmány szerinti megoldásokban a transzdukciónkat a J. H. Miller, „Experiments in Molecular Genetics” [Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1972.) 201—205] című kiadványban ismertetett módon végeztük.

#### 1. Példa

##### MGO baktérium törzs előállítása

C600 baktériumtörzset (ATCC 23724) (E. coli SuII<sup>+</sup> galK LasZ suII<sup>+</sup> thi) a  $\lambda$ c1857 P3 029 (W. Syzbaleski, Wisconsin Egyetem ajándéka) fág jelenlétében inkubáltuk. Egész éjszakán át 32°C hőmérsékleten hagytuk a tenyészetet növekedni, majd az életben maradt baktériumokat izoláltuk és tisztítottuk. E baktériumok 80%-a immunisnak bizonyult a felülfertőzéssel szemben, nem tudott 44°C-on továbbfejlődni, és 44°C-on való kezelés után lambda fágokat termelni, mely a  $\lambda$ c1857 P3 029 fágtól megkülönböztethetetlen volt [melyet igazol, hogy e fágok képesek plakkokat képezni a C600 baktérium törzsön, azonban N99 (E. coli K12 galK lacZ suO thi) baktérium törzsön nem]. Az életbenmaradt bak-

8

tériumok egy részét megtisztítottuk és MGO törzsnek [C600 ( $\lambda$ c1857 P3 029)] neveztük el.

#### 2. Példa

##### MGO-AR6 baktériumtörzs előállítása

- Az N5151 [E. coli K12 SA500 galK lacZ pro thr his gal8 ( $\lambda$  c1857  $\Delta$ 58—71  $\Delta$ H1)] baktériumtörzset az AR4 [E. coli K12 gal::tn10 (Plcm100)] baktériumtörzsön tenyésztett Plcm100 fág jelenlétében inkubáltuk. Az N5151 baktérium és az AR4 baktériumon tenyésztett Plcm100 fág közötti keresztezés tetraciklinnel szemben rezisztens, ultraibolya sugárzással és hőmérséklettel szemben érzékeny lizogén baktériumokat eredményezett. Az izolált baktériumok közül egyet megtisztítottunk és MGO-AR6-nak [E. coli K12 gal8 gal::tn10  $\lambda$   $\Delta$  58—71 c1857  $\Delta$  H1 (bio uvrB)] neveztük el.

#### 3. Példa

##### MG1 baktériumtörzs előállítása

- Az MGO-AR6 baktériumtörzset Plcm100 lizogénné tettük úgy, hogy az AR6 baktériumokat Plcm100 fág jelenlétében inkubáltuk, és az életbenmaradt baktériumokat izoláltuk. A Plcm100 lizogén MGO-AR6 baktériumokat MGO-AR18 törzsnek neveztük el.

30

- Az MGO baktériumtörzset az MGO-AR18 baktériumtörzsön tenyésztett Plcm100 fággal kereszteztük P1 transzdukción révén. Elég időt hagyva, hogy a baktériumok abszorbeálják a fágokat, a baktériumokat 4 J/m<sup>2</sup> erősségű ultraibolya sugárzásnak vetettük alá (az ultraibolya sugárzásmérő szerint a 254 nm fény sugárzása 2 J/m<sup>2</sup> erősségű volt), és tetraciklin jelenlétében inkubáltuk. A tetraciklinnel szemben rezisztens kolóniák 11%-a volt rezisztens az ultraibolya sugárzással szemben, jelezve, hogy nem hordozzák a H1 deléciót, így tehát a lambda géneket a cl-től a fág jobboldali végéig terjedően tartalmazzák. Pontosabban ez azt jelenti, hogy e klónok hordozzák a P3 és 029 mutációkat, valamint érintetlen S és R géneket. Az ultraibolya sugárzással és tetraciklinnel szemben rezisztens baktériumsejtek egyharmada nem volt képes fágot termelni. Ennélfogva úgy véljük, hogy ezeknél a lambda DNS 58—71. helye szerinti gének delécióval kiestek, tehát elvesztették az ind, xis és kil géneket. Ezt a csoportot tisztítottuk és MG1 (C600) [( $\lambda$ 58-71 c1857 P3 029) SuII<sup>+</sup> galK lacZ thi gal::tn10 tet<sup>r</sup>)] törzsnek neveztük el.

55

#### 4. Példa

##### MG3 baktériumtörzs előállítása

- Az MG1 baktériumtörzset a Plcm100 fág jelenlétében inkubáltuk és az életbenmaradt baktériumokat tisztítottuk. Az életbenmaradt baktériumok között nagy százalékban voltak olyan MG1 baktériumsejtek, melyek Plcm100 lizogénné váltak. A Plcm100 lizo-

65

gén MG1 baktériumokat tisztítottuk, és az MG2 baktériumtörzs elnevezést kapták.

Az N99 baktériumtörzset (ATCC 33956) az MG2 baktériumtörzsről tenyésztett Plcm100 fággal Plcm100 transzdukció révén kereszteltük. A tetraciklinnel szembeni rezisztenciával rendelkező baktériumokat kiválasztottuk. Valamennyi ilyen baktériumot a lambda fággal szemben immunisnak találtuk, így megállapítottuk, hogy a lambda lizogéneké váltak. E lizogének közül egyet megtisztítottunk és MG3 [N99 ( $\lambda$ D58—71 cI857 P3 029)] törzsnek neveztük el.

Az MG3 törzsről megállapítottuk, hogy 90—120 percig tartó 44°C-os hőmérséklet hatására lizisen megy keresztül. A sejt kultúrákban nem találtunk fágokat sem az előbb említett kezelés előtt, sem utána ( $3,3 \times 10^8$  baktériumsejtet tartalmazó tenyészetben 1 fágnál kevesebb 0,1 ml-enként). A fágok jelenlétét a C600 baktériumsejteken vizsgáltuk. A nem hibás lambda fágokat tartalmazó, kontrollként alkalmazott E. coli törzsek  $10^5$ — $10^9$  fágot tartalmaztak ml-enként olyan baktériumtenyészetben, melyben ml-enként  $3,3 \times 10^8$  baktériumsejt volt.

#### 5. Példa

##### MG3 baktériumtörzs előállítás

Az MG3 baktériumtörzset lényegében hasonlóan a 4. példa szerinti módszerhez állítottuk elő, azzal a különbséggel, hogy az N99 törzsnek a  $\lambda$ cI857 P3 029 fággal történő lizogéné tétele közvetlenül történt. A kapott lizogén baktériumot P1 transzdukcióval kereszteltük az MGO-AR18 baktériumtörzsszel és kiválasztottuk azokat a tetraciklinnel szemben rezisztens lizogéneket, melyek hőmérsékleti indukció hatására lizist szenvednek el, azonban fágokat nem termelnek.

#### 6. Példa

##### UC5822 baktériumtörzs előállítás

Az UC5822 baktériumtörzs előállítását az N99 baktériumtörzs  $\lambda$ int6 red3 cI587 P80 és  $\lambda$ hy5 cIimm21  $\Delta$ b2 fágokkal történő fertőzése révén történhet. A  $\lambda$ hy5 cIimm21  $\Delta$ b2 fág a  $\lambda$ fág és a 21-es fág hibridje. Ebben az esetben a  $\lambda$ hy5 cIimm21  $\Delta$ b2 fág célja az, hogy biztosítsuk az int funkció bevitelét a transzgenbe, mely, ahhoz szükséges, hogy a  $\lambda$ int6 red3 cI857 P80 fág lizogéné tegye ezt a törzset. A  $\Delta$ b2 mutáció alkalmatlanná teszi a  $\lambda$ hy5 cIimm21  $\Delta$ b2 fágot arra, hogy irányítsa a saját beépülését a baktériumtörzsbe. E keresztelésből azt a baktériumot, mely immunisnak bizonyult a lambda vírussal történő felülfertőzéssel szemben, azonban érzékeny volt a 21-es fágra, tisztítottuk és az UC5822 baktériumtörzs elnevezést kapta. Ez a törzs elpusztul, ha 44°C hőmérsékleten tartjuk. Nem lehet fágot kimutatni az UC5822 baktériumtörzsnél sem a 44°C-os hőmérsékleti kezelés előtt, sem utána.

#### 7. Példa

##### Az MG4 baktériumtörzs előállítása

MG3 baktériumot tenyésztünk Luria táptalajon vagy más teljesértékű táptalajon 32°C hőmérsékleten a logaritmus szaporodási fázis középértékéig (azaz  $A_{650}=0,5$  értékig). Ekkor a táptalaj megközelítően  $5 \times 10^8$  baktériumsejtet tartalmaz ml-enként. A baktériumtenyészetet ekkor 0,2% glükózzal és 0,2%  $KClO_3$ -al kiegészített Nutrient agar táptalajra (lemezre) visszük. Az agar lemezeket anaerob körülmények között 32°C-on inkubáljuk, amíg baktériumkolóniák nem keletkeznek (3—5 nap alatt). E táptalajon, a fenti körülmények közötti tenyésztés során kiválasztódnak azok az E. coli baktériumok, melyek a chl A, B, C vagy D génekben mutációval rendelkeznek. [J. Miller: Experiments in Molecular Genetics, 226—227].

A chlB, C vagy D gén mutációja még nem vezet az MG4 baktériumtörzs kiválasztásához. A chlA gén kifejezésére ható mutációk között a chlA pontmutációi és a chlA-tól jobbra vagy balra kiterjedő deléciók is vannak. A DNS láncon a chlA géntől balra kiterjedő deléció a szomszédos uvrB gén felszakadását (felbomlását) eredményezheti, mely eredményeképpen ultraibolya sugárzással szembeni érzékeny baktérium fenotípus jön létre. Ugyanilyen ok miatt, ha a deléció a chlD géntől jobbra történik a DNS láncon, akkor is ultraibolya sugárzással szemben rezisztens baktérium fenotípust állíthatunk elő. Az anaerob inkubálásból származó, kloráttal szemben rezisztens kolóniákat vizsgáltunk, hogy a kapott baktériumok érzékenyek-e az ultraibolya sugárzással szemben. E műveletet úgy végezhetjük el, ha egy Petri csészében egy kloráttal szemben rezisztens kolóniát szélesztünk, a csésze felét letakarjuk, és a másik felét  $10 \text{ J/m}^2$  erősségű 254 nm ultraibolya sugárzásnak vetjük alá. Ez a dózis elegendő ahhoz, hogy elpusztítsa az ultraibolya sugárzással szemben érzékeny baktériumsejteket, azonban a rezisztens mutánsokat nem. Az ultraibolya sugárzással szemben érzékeny mutánsokat (melyek közé a chlA és chlD génmutációk is tartoznak) megvizsgáljuk, hogy található-e bennük hibás lambda profág. Ezt úgy végezzük, hogy egy Petri csészében szélesztett homoimmun fágon keresztben szélesztjük a vizsgálandó baktériumokat, ezeket a fágokat az érintkezési helyeken elpusztítják, azonban a lambda lizogének immunisak a felülfertőzéssel szemben, így nem pusztulnak el. A chlA és a chlD gének, a lambda genom és az uvrB gén elhelyezkedéséből eredően valamennyi ultraibolya sugárzással szemben érzékeny chlD mutáns lambda fággal szemben érzékeny lesz, míg néhány ultraibolya sugárzással szemben rezisztens chlA mutáns lambda lizogén lehet. Az ultraibolya sugárzással szemben érzékeny lambda lizogéneknél tehát olyan chlA deléció történt, mely a DNS láncon bal felé, az uvrB-be nyúlik. Ha a deléció túlnyú-

17

lik az *uvrB* génen is, akkor benyúlhat a biotin operonba is és valószínűleg a szerkezeti lambda génnekbe is. Ezzel a módszerrel sikerült szerkezeti lambda gén deléciót elérni [Grier, Virology 66: 589–604 (1975)]. Valamennyi ultraibolya sugárzással szemben érzékeny *chlA*<sup>-</sup>, lambda lizogént *λ virA*<sup>-</sup> fággal megfertőztük. Két és fél óra eltelté után a lizálódott tenyészetet lemezre vittük a *λ virA*<sup>-</sup> fág és a *λ virA*<sup>+</sup> rekombinánsok kimutatása céljából. Azokat a baktériumokat, melyek szaporítják a *λ virA*<sup>-</sup> fágot és/vagy *λ virA*<sup>+</sup> fágot hoznak létre, eldobtuk; azoknál a baktériumoknál, melyek nem egészítik ki a *λ virA*<sup>-</sup> fágot, illetve nem termelnek *virA*<sup>+</sup> fágot olyan deléción történt, mely a lambda fág DNS láncán a *chlA* géntől indul ki és átmege az A génen is. Ez utóbbi baktériumokat a litikus tulajdonság kimutatására vizsgáltuk (lízis 38°C fölött történő tenyésztésnél). A litikus baktérium tulajdonságot megtartó, a deléciót tartalmazó egyedeket az MG4 törzsként tisztítottuk.

### 8. Példa

#### MM294(cI857) és UC5822 baktériumtörzsek klónozása

MM294 *E. coli* törzset (ATCC 33625) *λ cI857* fág jelenlétében inkubáltunk. Egy éjszakán át 32°C-on történő tenyésztés után az életben maradt baktériumokat izoláltuk és megtisztítottuk. Azokat a klónokat, melyek immunisak a felülfertőzéssel szemben, és amelyek 44°C hőmérsékleten nem képesek fejlődésre és fágképzésre, izoláltuk. Az így kapott *cI857* lizogén baktériumtörzset, az MM294 (*λ cI857*) törzset, és az UC5822 *E. coli* törzset  $\text{CaCl}_2$  kezeléssel kompetenssé tettük és pDN5 plazmiddal transzformáltuk, amely plazmid az *E. coli* LT-B antigén és az ampicillin és tetraciklin rezisztencia génjét hordozza.

Mindkét litikus baktériumtörzs ampicillinnel és tetraciklinnel szemben rezisztens transzformált sejtjei jól fejlődtek a standard húsleves táptalajon 30–32°C-on és LT-B antigént termeltek. A baktériumokat centrifugálással üledékbe vittük, és 42°C hőmérsékletű standard húsleves tápközegbe vittük. Körülbelül 90–120 perc alatt a lízis bekövetkezik, és lényegében be is fejeződik. Az LT-B antigén felszabadult, és a húslevesbe jutott. Milliliterenként  $4 \times 10^7$  MM294(*cI857*) transzformálást tartalmazó mintában körülbelül  $2 \times 10^8$  lambda fág mutatható ki. A hasonló UC5822 transzformáns mintában nem mutatható ki fág (20 fagnál kevesebb ml-enként).

### 9. Példa

#### UC5822 baktériumtörzs klónozása

Az *E. coli* LT-B antigén termelését kódoló géneket hordozó pESS2 plazmidot tartalmazó *E. coli* UC5822 baktériumtörzset egy 5 ml-es kémcsőbe oltottunk, melyben ampicillint tartalmazó L húsleves táptalaj volt. 6 óra eltelté után a kémcső tartalmát átvit-tük ampicillint tartalmazó 500 ml térfogatú tápközegbe, majd egy éjszakán át, rázás közben inkubáltuk 32°C-on. 10 l tenyészet készítéséhez az előbbi kultúrából 400 ml-t átvit-tünk 10 l tápközegbe, mely ampicillint tartalmazott, és az egészet egy Virtis bench-top fermentorba helyeztük. A tenyésztést 32°C-on végeztük, és óránként 100 ml mintát vettünk a növekedés mértékének megállapítására  $A_{420}$  refrakció érték mellett. 4 óra elteltével a tenyészethez 200 ml 50%-os glükózt és 0,1 ml habzástgátló anyagot adtunk. 8 óra eltelté után a kultúra 4,8  $A_{420}$  stádiumban volt, és a hőmérsékletet 43°C-ra emeltük. 10 óra eltelté után a tenyészethez ismét 200 ml 50%-os glükózt adagoltunk, és a kézdestől számított 14 óra elteltével a tenyésztést megállítottuk. A sejtkoncentrációból (üledék) és a felülúszóból a tenyésztés kezdetétől számított 4; 6; 8; 9; 10,6; és 14 órákor vett mintákat LT<sub>B</sub>-re nézve vizsgáltuk ELISA-val, standardként ismert koncentrációjú LT<sub>B</sub>-mintákat alkalmazva.

A kapott eredményeket az 1. táblázat mutatja. A tenyésztés kezdetétől számított 4–8 óra között LT-B antigén 90%-ánál nagyobb része a sejtekben maradt, azonban a hőmérséklet emelése után 2 órán belül (a beoltás után 10 órával) az LT-B antigén 90%-a a felülúszóban volt. A hőmérsékletváltoztatás után 6 órával az LT-B antigén 95%-a került a felülúszóba. Az LT-B antigén az összfehérje 8,5%-át adta. Az LT-B hozam sokkal jobb volt, mint a pESS2 plazmiddal transzformált MM294 *E. coli* törzs hozama.

A hőmérsékletváltás után 2–4 órán belül a tápközeg viszkozitásának növekedéséből és a látható sejttöredékből nyilvánvaló volt, hogy lízis történt. A hőmérsékletváltás után 4–6 órával a táptalaj viszkozitása jelentősen csökkent, és a táptalajt könnyen át lehetett szűrni egy ultraszűrőn a sejttörmelék és a megmaradt, nem lizálódott sejtek eltávolítása céljából. A megnövekedett viszkozitás azt mutatja, hogy nagy molekulatömegű DNS és RNS molekulák szabadultak fel és jutottak a tápközegbe. Az endogén nukleáz enzimek tevékenysége azonban végső soron azt eredményezte, hogy csökkent az oldat viszkozitása.

1. táblázat

| Beoltás után eltelt idő        | A <sub>420</sub>           | mg/ml sejt-<br>fehérje | µg/ml<br>LT <sub>B</sub> | Összes LT <sub>B</sub> az<br>összes sejtfehér-<br>je %-ában |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 43°C-ra<br>történő<br>átváltás |                            |                        |                          |                                                             |
|                                | 4 óra üle-<br>dékben       | 0,58                   | 0,734                    | 0,41                                                        |
|                                | 4 óra felül-<br>úszóban    |                        |                          | 0,06                                                        |
|                                | 6 óra üledék-<br>ben       |                        |                          | 1,1                                                         |
|                                | 6 óra felül-<br>úszóban    | 1,8                    | 1,19                     | 0,11                                                        |
|                                | 8 óra üledék-<br>ben       | 4,8                    | 1,24                     | 3,9                                                         |
|                                | 8 óra felül-<br>úszóban    |                        |                          | 0,29                                                        |
|                                | 10 óra üledék-<br>ben      | 6,2                    | 0,646                    | 1,2                                                         |
|                                | 10 óra felül-<br>úszóban   |                        |                          | 14,8                                                        |
|                                | 10,6 óra üle-<br>dékben    | 5,0                    | 0,652                    | 1,8                                                         |
|                                | 10,6 óra fe-<br>lülúszóban |                        |                          | 39,38                                                       |
|                                | 14 óra üledék-<br>ben      |                        |                          | 1,8                                                         |
|                                | 14 óra felül-<br>úszóban   | 4,2                    | 0,652                    | 53,83                                                       |

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hőmérsékletérzékeny baktériumok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely baktériumtörzset olyan DNS fragmenssel transzformálunk, amely a következő elemeket tartalmazza:

i) szelektáló marker,

ii) olyan lambda profág DNS szekven-  
cia, amely egy hőmérsékletérzékeny cl re-  
presszor gént és funkcionális lizozim-kódoló  
géneket tartalmaz úgy, hogy a lizozim-kó-  
doló géneket permisszív hőmérsékleti körü-  
lmények között gátolva vannak, míg restriktív  
hőmérsékleti körülmények között kifeje-  
ződnek, és funkcionális N, Q, S és R géne-  
ket is tartalmaz, és amelyből a kromoszóma-  
térkép 3. és 71. helyei közötti, de legalább az  
58. és 71. helyei közötti gének delécióval ki-  
estek, és az O és P génekben történt mutá-  
ciók következtében az O és P génfunkciókat  
elvesztette, és

iii) a fragmens és gazdasejt kromoszó-  
mája között rekombinációt lehetővé tevő, a  
baktérium gazdasejt kromoszómájában köz-

vetlenül szomszédos szekvenciával homológ,  
szomszédos DNS szekvenciák.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan DNS fragmenst al-  
kalmazunk, amely cl génként cl857 gént, O  
és P mutánsként 029 és P3 mutánst és sze-  
lektálható markerként tn10 átvihető tetracik-  
lint rezisztencia elemet tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan lambda profág DNS  
fragmenst alkalmazunk, amelyből a kromo-  
szómatérkép 3. és 71. helyei közötti gének  
delécióval kiestek.

4. Az 1—3. igénypontok bármelyike sze-  
rinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy bakté-  
riumként valamely E. coli törzset alkalma-  
zunk.

5. Eljárás valamely fehérjetermék előál-  
lítására baktérium segítségével, *azzal jelle-  
mezve*, hogy valamely, az 1. igénypont sze-  
rinti eljárással előállított hőmérsékletérzé-  
keny baktériumtörzset, amely a tárgyi kör  
szerinti fehérje-terméket intracellulárisan fe-  
jezi ki, és a profág DNS-szekvencián belül  
egy hőmérsékletérzékeny fág represszor gént  
és funkcionális lizozim-kódoló fág géneket

hordoz olyan módon, hogy a lizozim-kódoló gének permisszív hőmérsékleti körülmények között gátolva vannak, míg restriktív hőmérsékleti körülmények között kifejeződnek, permisszív, a termék képződésének kedvező hőmérsékleti körülmények között tenyésztjük; majd a hőmérséklet megemelésével restriktív körülményeket teremtünk, és adott esetben a terméket a tenyészközegből vagy annak koncentrátumából kinyerjük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hőmérséklettel szemben érzékeny baktériumtörzsként egy hőmérséklettel szemben érzékeny lambda cI gént hordozó baktériumtörzset alkalmazunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy lambda cI génként a cI857 mutáns gént hordozó baktériumtörzset alkalmazunk.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumtörzsként valamely E. coli lambda lizogén törzset alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumtörzsként E. coli UC822 törzset alkalmazunk.

10. Az 5—9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumtörzsként egy olyan lambda profág DNS szekvenciát hordozó baktériumtörzset alkalmazunk, melyből delécióval kiestek a kromoszómatérkép 58. és 71. helye közötti gének és az O és P génekben mutáció történt.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan baktériumtörzset alkalmazunk, amelyben a lambda profág DNS

szekvencia szomszédos egy szelektálható markerrel és az O és P mutációk pontmutációk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan baktériumtörzset alkalmazunk, amelyben a lambda profág DNS szekvencia a felső végén szomszédos a tn10 átvihető tetraciklin rezisztencia elemmel, valamint az O gén azonos az O29 génnel és a P gén a P3 génnel.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy baktériumtörzsként valamely E. coli MG törzset alkalmazunk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy baktériumtörzsként E. coli MG3 törzset alkalmazunk.

15. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumtörzsként egy olyan lambda profág DNS szekvenciát hordozó baktériumot alkalmazunk, melyből delécióval kiestek a kromoszómatérkép 3. és 71. helye közötti gének és az O és P génekben mutáció történt.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan baktériumtörzset alkalmazunk, amelyben a lambda profág DNS szekvencia szomszédos egy szelektálható markerrel és az O és P mutációk pontmutációk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan baktériumtörzset alkalmazunk, amelyben a lambda profág DNS szekvencia a felső végén szomszédos a tn10 átvihető tetraciklin rezisztencia elemmel, valamint az O gén azonos az O29 génnel és a P gén a P3 génnel.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumtörzsként egy E. coli MG4 törzset alkalmazunk.

Rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest  
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 8503. Nyomdaipari vállalat, Ungvár