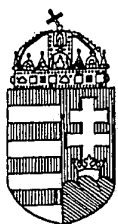


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 566 B

- (21) A bejelentés száma: 2775/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 05. 31.
(30) Elsőbbségi adatok:
138 628/871987. 06. 01. JP
235 492/871987. 09. 18. JP
251 144/871987. 10. 05. JP
(83) Letétbe helyezés: FERM BP-1843; FERM BP-1842;
FERM BP-1841; FERM BP-1591; FERM BP-1595
(40) A közzététel napja: 1989. 04. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/61
C 12 P 21/04

(72) Feltalálók:

Toyoshima, Kumao, Tokió (JP)
Horiuchi, Ryuya, Gunma (JP)
Yamauchi, Kiyoshi, Shizuoka (JP)
Yamamoto, Tadashi, Kanagawa (JP)
Igarashi, Koichi, Kyoto (JP)

(73) Szabadalmaz:

Takeda Chemical Industries Ltd., Osaka (JP)

**(54) Eljárás diszulfid-izomerázt kódoló DNS-t hordozó expressziós vektor,
transzformált mikroorganizmus és diszulfid-izomeráz polipeptid előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás diszulfid-izomeráz-polipeptid előállítására, amely katalizálja a fehérjében a legstabilabb természetes típusú diszulfidkötések képzéséhez szükséges szulfhidril-diszulfid cserebomlást és prokariótasejt által előállított fehérjékben felhasználható a természetes típusú diszulfidkötések kialakítására.

A találmány tárgya továbbá eljárás a fenti diszulfid-izomeráz-polipeptid aminosavszekvenciáját kódoló bá-zisszekvenciájú rekombináns DNS-t tartalmazó vektor, és ezzel transzformált mikroorganizmus előállítására.

HU 204 566 B

A találmány tárgya eljárás fehérje-diszulfid-izomeráz-aktivitással rendelkező polipeptid és ehhez alkalmazható mikroorganizmus és vektor előállítására.

Ismert, hogy a diszulfidkötések fontos szerepet játszanak a fehérjék konfigurációjának megőrzésében és hatásuk kifejezésében. Eukariótasejtekben a diszulfidkötések az endoplazmatikus retikulumban képződnek, a fehérjetranszlációval egy időben vagy közvetlenül az után [J. Biol. Chem. 257, 8847 (1982)]. A diszulfidkötések nem enzimatis úton in vitro is kialakíthatók, de az átalakulási rátája alacsonyabb, mint in vivo, és az in vitro körülmények eltérnek az in vivo körülményektől. A fentiek alapján Anfinsen és munkatársai feltételezték, hogy a diszulfidcserélő fehérje néven ismert molekula hatással lesz a diszulfidkötések in vivo kialakítására [J. Biol. Chem. 238, 628 (1963)]. Bár ez a feltételezés hipotézis maradt, különböző eukariótákból olyan enzimeket izoláltak, amelyek redukált és felgombolyított ribonukleáz (mindkettő inaktív forma) reagálva elősegítik a ribonukleáz aktiváló valódi diszulfidkötések képzését [Biochemistry, 20, 6594 (1981), Biochem. J. 213, 225 (1983), Biochem. J. 213, 245 (1983)]. A felgöngyöltött ribonukleáz, amely redukcióval és ismételt oxidációval állítható elő denaturáló körülmények között, az aktív ribonukleáz négy pár diszulfidkötésének véletlenszerű rekombinálásával kialakult különböző molekulák keveréke [Biochem. J. 213, 235 (1983)]. Az inaktív ribonukleáz aktiváló enzimet fehérje-diszulfid-izomeráznak (PDI, EC 5.3.4.1) nevezik, ami egy dimer molekula, amely két azonos, egyenként 52 000–62 000 közötti móltömegű alegységből áll, izoelektromos pontja 4,0–4,5 [Trends in Biochem. Sci. 9, 438 (1984), Methods in Enzymol. 107, 281 (1984)]. Feltételezhető, hogy a korábban ismert fehérje-diszulfid-reduktáz (más néven glutathion-inzulin-transzshidrogenáz, EC 1.8.4.2) azonos a PDI-vel [Eur. J. Biochem. 32, 27 (1973), Biochemistry 14, 2115 (1975)].

Edman és munkatársai 1985-ben patkánymáj PDI komplementer DNS-t klónoztak és meghatározták teljes bázisszekvenciáját [Nature, 317, 267 (1985)]. A patkánymáj PDI 489 aminosavból és egy szignálpeptidből áll, amely a fehérje N-terminális végéhez csatlakozik, és 19 aminosavból áll. Vannak olyan szakaszai, amelyek homológok az Escherichia coli tioredoxinnal [Eur. J. Biochem. 6, 475 (1968), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2305 (1975), Methods in Enzymol. 107, 295 (1984)], amely számos oxidációs-redukciós reakció, így a ribonukleotid-reduktáz reakció kétoldali, vagyis az N-terminális és a C-terminális közötti támadáspontú kofaktora. Mindegyik szakasz tartalmaz olyan homológ szekvenciát, amely két ciszteint tartalmazó (Trp-Cys-Gly-Cys-Lys) egységet tartalmaz, amely feltehetően diszulfid- és szulfhidrilcsere alapján katalizálja a PDI-reakciót. Ismert az is, hogy az Escherichia coli tioredoxin PDI-aktivitással rendelkezik, ha szubsztátumként redukált vagy felgöngyöltött ribonukleáz alkalmazunk [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7643 (1986)].

A PDI többek között felhasználható Escherichia coli-ból nyert rekombináns fehérjék összehajtogatására. A géntechnológia gyors fejlődésének köszönhetően le-

hetővé vált eukarióta-fehérjék nagy tömegű előállítására Escherichia coli segítségével, de az így nyert rekombináns fehérjékből hiányozhatnak a valódi diszulfidkötések, vagy rosszul kialakított diszulfidkötéseket tartalmazhatnak [EMBO Journal, 4, 775 (1985); Genetic Engineering, 4. kötet, Williamson R, 127 (1983)]. A megfelelő diszulfidkötéseket tartalmazó aktív rekombináns fehérje előállításához hajtogatásra van szükség. Ez a folyamat megvalósítható kémiai úton redox pufferban végzett oxidációs-redukciós reakciókkal, azonban az in vivo hatású PDI alkalmazása megfelelő diszulfidkötések speciális kialakításához sokkal előnyösebb. A PDI alkalmazása különösen nagy számú diszulfidkötést tartalmazó rekombináns fehérjék esetében előnyös. Lehetséges az is, hogy PDI-kódoló gént viszünk be a transzformált Escherichia coli-ba és a sejten belül ezzel reagáltatjuk a rekombináns fehérjét.

Az ismert PDI-előállítások hátránya, hogy a kiindulási anyag nehezen hozzáférhető és a kinyerhető PDI mennyisége korlátozott. Szükség van tehát olyan eljárásra, amely lehetővé teszi nagy tisztaságú PDI tömegtermelését. Patkánynál és szarvasmarhánál már klónozták a PDI-géneket [Nature, 317, 267 (1985)], de eddig még nem ismert tisztított aktív PDI előállítása PDI-gének Escherichia coli-ban történő kifejezésével. Nem ismert továbbá PDI az említett eukariótasejtektől eltérő eukariótasejtekkel történő klónozása sem.

Vizsgáltuk a T3 megkötőfehérje (T3 binding protein, rövidítve T3BP) biológiai hatását és fehérjekémiai tulajdonságait, amelyek speciális kötést létesítenek a T3 pajzsmirigy-hormonnal (3,3',5-trijód-tironin, rövidítve T3). A T3BP emlős sejtek membránjában és citoplazmájában, a T3 receptor a sejtmagban található. Vizsgálataink során megfelelő antitestet állítottunk elő szarvasmarha májsejtmembránból nyert tisztított T3BP ellen [Horiuchi, R. és Yamauchi, K.: Gunma Symposium on Endocrinology, 23 (Center of Academic Publication Japan, Tokyo, VNU Science Press, BV, Utrecht), 149–166 (1986)] és a T3BP-t kódoló gént különböző géntechnikai eljárásokkal klónoztuk. Azt találtuk, hogy a fenti anti-T3BP antitest alkalmazásával kapott szarvasmarhamáj T3BP cDNS kódolja a szarvasmarha PDI-fehérjét (PCT/JP87/00 058 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés, 1987. január 28.).

Az emberrel közeli rokonságban lévő állatok fehérjéi aminosavszekvenciájukban általában különösen jó homológiát mutatnak az emberi fehérjékkel szemben, valamint a kodon pontmutációjából származó különböző aminosavak eloszlásában. Ebből arral lehet következtetni, hogy az említett szarvasmarha T3BP (PDI) gén DNS-szekvenciája megfelel a humán PDI-gén DNS-szekvenciájának. Azt találtuk, hogy a humán PDI előállítható, ha humán sejtekből humán PDI-gént klónozzunk, amelynek során DNS-mintaként a szarvasmarha PDI-gén egy részét alkalmazzuk, az adott humán PDI-gént tartalmazó rekombináns DNS-t előállítjuk, és a DNS transzformálásával kapott transzformánsokat tenyésztjük.

A találmány tárgya tehát eljárás a 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát tartalmazó polipeptid előállítására, az ábrán

Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala vagy Pro,

oly módon, hogy a fenti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó és replikálható vektorral transzformált mikroorganizmust tenyésztünk, a tenyészetben a polipeptidet felhalmozzuk és feltárjuk.

Az oltalmi kör kiterjed a 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó és replikálható vektorral transzformált mikroorganizmus és az említett vektor előállítására.

A találmány tárgya továbbá eljárás eukarióta-szervezet természetes típusú diszulfidkötést tartalmazó fehérjének előállítására, oly módon, hogy az eukarióta-szervezet prokariótasejt által előállított fehérjét a 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát tartalmazó polipeptiddel reagáltatjuk, az ábrán

Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala vagy Pro.

A 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciaként előnyösen alkalmazható az 5. ábrán megadott szekvencia. Az 5. ábrán a szekvenciát kettős sorokban adjuk meg, ahol a felső sor az aminosavszekvenciát és az alsó sor a bázisszekvenciát mutatja. Különösen előnyösen alkalmazható az 5. ábra szerinti bázisszekvencia 104–1573 közötti része, ahol a 104 a +1 aminosavat kódoló kodon első bázisa és az 1573 a +490 aminosavként szereplő Leu-t kódoló kodon 3. bázisa. Előnyös továbbá az 5. ábra szerinti bázisszekvencia 104–1573 közötti része egy ATG translációs startkodonnal vagy 5' végétől felfelé a bázisszekvencia 50–103 közötti részével kiegészítve, ahol az 50 a -18 aminosavként szereplő Met-et kódoló kodon első bázisa és a 103 a -1 aminosavként szereplő Asp-t kódoló kodon 3. bázisa.

Példaként említhető az a bázisszekvencia, amelyben az 5. ábra szerinti bázisszekvencia 104–1573 közötti részéhez az 5' végtől felfelé GAC vagy ATGGAC kapcsolódik; az 5. ábra szerinti bázisszekvencia 107–1573 szakasza; valamint az 5. ábra szerinti bázisszekvencia 107–1573 közötti szakasza, amelyhez az 5' végtől felfelé ATG kapcsolódik.

A találmány szerinti eljárással előállítható humán PDI-polipeptidre példaként említhető a Z helyén Ala-maradékot tartalmazó 3. ábra szerinti polipeptid; a Z helyén MetAla-maradékot tartalmazó 3. ábra szerinti polipeptid; N-terminálisan az 5. ábra szerinti -18 és -1 közötti aminosavszekvenciával kiegészített 3. ábra szerinti polipeptid; N-terminálisan Asp- vagy MetAsp-maradékkal kiegészített 3. ábra szerinti polipeptid; 5. ábra szerinti +1 Ala-maradékkal kiegészített 3. ábra szerinti polipeptid; valamint Met-maradékkal helyettesített 5. ábra szerinti +1 Ala-maradékkal kiegészített 3. ábra szerinti polipeptid.

A peptid alkalmazható cukorral kapcsolt glikoprotein vagy más polipeptiddel kapcsolt fehérje formájában.

A találmány szerinti humán PDI-polipeptidet kódoló bázisszekvenciát hordozó kifejező vektor előállítható például úgy, hogy

(i) humán PDI-t kódoló mRNS-t izolálunk,

(ii) az RNS-ből egyszálú komplementer DNS-t (cDNS), majd kétszálú DNS-t szintetizálunk,

(iii) az adott komplementer DNS-t fágba vagy plazmidba visszük be,

(iv) a kapott rekombináns fagot vagy plazmidot gazdasejtbe transzformáljuk,

5 (v) a kapott transzformánst tenyésztjük, majd a kívánt DNS-t hordozó fagot vagy plazmidot megfelelő módszerrel, így anti-T3BP antitest alkalmazásával immunoassay-módszerrel vagy folt-hibridizációval vagy radioaktív jelzésű minta segítségével telep-hibridizációval elválasztjuk a transzformánstól,

10 (vi) a kívánt klónozott DNS-t kihalásítjuk a fágból vagy plazmidból, és

(vii) a klónozott DNS-t a promotortól lefelé egy hordozóhoz ligáljuk.

15 A humán PDI-t kódoló mRNS különböző, humán PDI-t termelő sejtekből, így humán májsejtekből és méhlepénysejtekből előállítható.

Az RNS a humán PDI-t előállító sejtekből előállítható például a guanidin-tiocianát módszerrel [Chirgwin, J. M. és munkatársai: *Biochemistry*, 18, 5294 (1979)].

A kapott RNS-t templátként alkalmazva reverz transzkriptáz segítségével szintetizáljuk a cDNS-t, például Okayama, H. és munkatársai módszerével [Mol. Cell. Biol. 2, 161 (1982) és ugyanitt 3, 280 (1983)] vagy Gubler U. és Hoffmann, B. J. módszerével [Gene, 25, 263 (1983)], majd a kapott cDNS-t plazmidba vagy fágba visszük be.

A cDNS beépítésére alkalmazható plazmidokra példaként említhető az *Escherichia coli*-ből származó pBR322 plazmid [Gene, 2, 95 (1977)], a pBR325 plazmid [Gene, 4, 121 (1978)], a pUC12 plazmid [Gene, 19, 259 (1982)] és a pUC13 plazmid [Gene, 19, 259 (1982)], valamint a *Bacillus subtilis*-ből származó pUB110 plazmid [Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 678 (1983)], továbbá bármely olyan plazmid, amely az adott gazdasejtben replikálódik. A cDNS beépítésére alkalmazható fág vektora példaként említhető a λ gt 11 (Young, R. és Davis, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1194 (1983)], valamint bármely olyan fágvektor, amely az adott gazdasejtben szaporodik.

A cDNS-nek a plazmidba történő beépítésére alkalmazható például Maniatis, T. és munkatársai módszere [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 239 (1982)]. A cDNS-nek a fágvektorba történő beépítésére alkalmazható például Hyunh, T. V. és munkatársai módszere (DNS Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)). A kapott plazmidot vagy fágvektort megfelelő gazdasejtbe, így *Escherichia coli*-ba vagy *Bacillus subtilis*-be visszük be.

50 *Escherichia coli*-ként alkalmazható törzsek a K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 160 (1968)], a JM103 [Nucl. Acids Res. 9, 309 (1981)], a JA221 [J. Mol. Biol. 120, 517 (1978)], a HB101 [J. Mol. Biol. 41, 459 (1969)] és C600 [Genetics, 39, 440 (1954)].

Bacillus subtilis-ként alkalmazható törzs például az MI 114 [Gene, 24, 255 (1983)] és a 207–21 [J. Biochem. 95, 87 (1984)].

A gazdasejtplazmiddal történő transzformálása megvalósítható például a kalcium-klorid módszerrel és a

kalcium-klorid/rubídium-klorid módszerrel [Maniatis, T. és munkatársai: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 249 (1982)]. Ugyanígy a fágvektor az *Escherichia coli*-ba bevezethető például *in vitro* módszerrel.

A kapott transzformánsból a kívánt klónt a szokásos módszerrel, például telephibridizálással [Gene, 10, 63 (1980)], folthibridizálással [Science, 196, 180 (1977)] vagy DNS-bázisszekvencia meghatározás módszerével [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977), Nucl. Acids Res. 9, 309 (1981)] választjuk ki.

Ezzel az eljárással olyan mikroorganizmust kapunk, amely a humán PDI-t kódoló bázisszekvenciát tartalmazó klónozott DNS-t tartalmazó vektort hordozza.

Az *Escherichia coli* K12 DH 5A/P T3BP-3 által hordozott P T3BP-3 plazmid, lásd 1. példa, olyan DNS-t tartalmaz, amely humán PDI-t kódoló bázisszekvenciát tartalmaz. A 4. ábra az adott DNS restrikciós enzimes hasítóhelyeit mutatja. A 4. ábra szerint az adott DNS teljes hosszúsága mintegy 2,4 kbp, és BamHI, EcoRI, ClaI, HindIII és PstI restrikciós enzimekkel fragmensekre hasítható.

A plazmidot vagy a fágvektort ezután izoláljuk a mikroorganizmusból. Az izolálás megvalósítható például lúgos extrakciós módszerrel [Birmboim, H. C. és munkatársai: Nucl. Acids Res. 1, 1513 (1979)].

Az említett plazmid vagy fágvektor, amely a humán PDI-t kódoló bázisszekvenciát tartalmazó DNS-t hordozza, felhasználható önmagában vagy szükség esetén restrikciós enzimekkel végzett emésztés után.

A klónozott gén kifejezéséhez megfelelő hordozó (vektor) promotortól lefelé eső helyére ligálható, és így kifejező vektort kapunk.

Vektorként alkalmazható a fent említett *Escherichia coli* eredetű plazmid (például pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, ptp781), *Bacillus subtilis* eredetű plazmid (például pUB110, pTM5, pC194), élesztő eredetű plazmid (például pSH19, pSH15, pGLD906, pGLD906-1, pCDX, pKSV-10), bakteriofág, így λ -fág, valamint állati vírus, így retrovírus vagy vakcinavírus.

Az említett gén 5' végén transzlációs startkodonként ATG-t és 3' végén transzlációs zárókodonként TAA-t, TGA-t vagy TAG-t tartalmazhat. A gén kifejezéséhez egy promotort kapcsolunk az említett géntől felfelé eső helyhez. Promotorként a találmány értelmében bármely olyan promotort felhasználhat, amely az említett gén kifejezéséhez alkalmazott gazdasejthez alkalmazható.

Ha a transzformáláshoz alkalmazott gazdasejt *Escherichia coli*, előnyösen trp-promotort, lac-promotort, rec-promotort, λ P_L promotort, vagy lpp-promotort alkalmazunk. Ha a gazdasejt *Bacillus subtilis*, promotorként előnyösen SP01 promotort, SP02 promotort vagy penP promotort alkalmazunk. Ha a gazdasejt élesztő, promotorként előnyösen PHO5 promotort, PGK promotort, GAP (GLD) promotort vagy ADH-promotort alkalmazunk. Előnyösen úgy járunk el, hogy gazdasejtként *Escherichia coli*-t és promotorként trp-promotort vagy λ P_L promotort használunk.

Ha gazdasejtként állati sejtet használunk, promotorként alkalmazható többek között SV40 származékpro-

motor vagy retrovírus promotor. Előnyösen alkalmazható az SV40 származékpromotor.

Az így előállított vektort, amely a 3. ábra szerinti bázisszekvenciát kódoló DNS-t hordozza, használjuk a transzformáns előállításához.

Gazdasejtként alkalmazhatók például prokarióták, így *Escherichia coli*, vagy *Bacillus subtilis* és *Actinomyces*-félék, valamint eukarióták, így élesztő, gomba és állati sejtek.

Az *Escherichia coli* és *Bacillus subtilis* törzsekre példaként említhetők a fent leírt törzsek, élesztőtörzsekre példaként említhető a *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A és DKD-5D, állati sejtekre példaként említhető a majom COS-7 sejt és Vero-sejt, a kínaihörcsög CHO-sejt és az egér L-sejt.

A transzformáció *Escherichia coli* esetében megvalósítható például a Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2110 (1972) vagy a Gene 17, 107 (1982) helyen leírt módszerrel, a *Bacillus subtilis* esetében például a Molec. Gene Genet. 168, 111 (1979) helyen leírt módszerrel, élesztősejtek esetében például a Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978) helyen leírt módszerrel, és állati sejtek esetén például a Virology 52, 456 (1973) helyen leírt módszerrel. Ezzel az eljárással a 3. ábra szerinti bázisszekvenciát hordozó vektorral transzformált transzformánsokat kapunk.

Az *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces*, élesztő- vagy gombasejt transzformálásával kapott transzformánsok tenyésztéséhez folyékony tápközeget alkalmazunk, amely tartalmazza az adott transzformáns növekedéséhez szükséges anyagokat, például szénforrást, nitrogénforrást, és szerves tápanyagokat. Szénforrásként alkalmazható például glükóz, dextrin, oldható keményítő és szacharóz, nitrogénforrásként például szerves vagy szerves vegyület, így ammóniumsó, nitrátsó, kukoricafehérje, pepton, kazein, húskivonat, szójababkivonat és burgonyakivonat. Szerves tápanyagként alkalmazható például kalcium-klorid, nátrium-dihidrogén-foszfát és magnézium-klorid.

A tápközeg pH-értéke előnyösen 5–8 között van.

Escherichia coli alkalmazása esetén tápközegként előnyösen alkalmazható az M9 tápközeg, amely glükózt és kazamínosavakat tartalmaz [Miller: J. Exp. Mol. Genet. 431, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)]. A tenyésztést általában mintegy 14–43 °C közötti hőmérsékleten mintegy 3–24 órán keresztül végezzük szükség esetén levegőztetés és/vagy kevertetés közben.

Bacillus subtilis alkalmazása esetén a tenyésztést általában mintegy 30–40 °C hőmérsékleten mintegy 6–24 órán keresztül végezzük szükség esetén levegőztetés és/vagy kevertetés közben.

Élesztő alkalmazása esetén tápközegként előnyösen alkalmazható a Burgholder-féle minimum tápközeg [Bostian, K. L. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4505 (1980)] és módosított alacsony Pi-tartalmú változata [Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 268 (1986)]. A tápközeg pH-értéke előnyösen 5–8 között van. A tenyésztést általában mintegy 20–35 °C hőmérsékleten mintegy 24–72 órán keresztül végezzük kívánt esetben levegőztetés és/vagy kevertetés közben.

Állati sejtek alkalmazása esetén tápközegként előnyösen alkalmazható a MEM-tápközeg [Science, 122, 501 (1952)], a DMEM-tápközeg [Virology 8, 396 (1959)], az RPMI 1640 tápközeg [J. Am. Med. Assoc. 199, 519 (1967)] és a 199 tápközeg [Proc. Soc. Ex. Biol. Med. 73, 1 (1950)], amelyek további adalékként mintegy 5–20 tömeg% magzati borjúsérumot tartalmazhatnak. A tápközeg pH-értéke előnyösen 6–8 között van. A tenyésztést általában mintegy 30–40 °C hőmérsékleten mintegy 15–60 órán keresztül végezzük, szükség esetén levegőztetés és/vagy kevertetés közben.

A találmány szerinti humán PDI-fehérje intracellulárisan vagy extracellulárisan termelődik és felhalmozódik. Az intracelluláris PDI extrahálása a szokásos módszerekkel megvalósítható, például tenyésztés után a sejteket ismert módon összegyűjtjük, majd fehérjedénaturálót, így guanidin-hidrokloridot vagy karbamidot vagy felületaktív anyagot, így triton-X-100-at tartalmazó pufferban szuszpendáljuk, és az így kapott felülúszót, amely a humán PDI-t tartalmazza, centrifugáljuk, vagy eljárhatunk úgy is, hogy a sejteket üveggyönggyel, ultrahangos kezeléssel vagy enzimessé, így lizozimos kezeléssel vagy fagyasztás-felolvasztás módszerrel roncsoljuk, majd a kapott felülúszót, amely a humán PDI-t tartalmazza, centrifugáljuk.

Az extracellulárisan előállított humán PDI elválasztására és tisztítására a szokásos módszereket alkalmazzuk. Példaként említhető az oldékonyság-különbségen alapuló módszer, így kisózás vagy oldószeres kicsapás, a molekulatömeg különbségen alapuló módszer, így a dialízis, ultraszűrés, gélszűrés és SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis, ioncserés kromatográfia, amely specifikus affinitáson alapuló módszer, így az affinitáskromatográfia, a hidrofób jelleg különbségen alapuló módszer, így reverz fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia, az izoelektromos pont különbségen alapuló módszer, így az izoelektromos elektroforézis, valamint a specifikus abszorpción alapuló módszer, így a hidroxipatit-kromatográfia. Előnyösen alkalmazható az ioncserés kromatográfia, amelynek során a humán PDI savas fehérjeként kötődik. Az ioncserés kromatográfiát előnyösen dietil-amino-etil-cellulózzal vagy karboxi-metil-cellulózzal végezzük.

A kapott humán PDI-fehérje aktivitását a redukált és feltekerített ribonukleáznak aktív ribonukleázra történő átalakítási rátájának mérése alapján határozzuk meg [Biochem. J. 159 377 (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7643 (1986), Methods in Enzymology 107, 281 (1984), J. Biol. Chem. 234, 1512 (1959)].

A találmány szerinti humán PDI-fehérje a fehérjék szulfhidril-diszulfid cserebomlását katalizálja, amely a legstabilabb természetes típusú diszulfidkötések képződéséhez vezet. Közelebbről, a fehérje oldott oxigén, oxidált glutation (GSSG) – redukált glutation (GSH) elegy vagy redukálószer, így ditiotritol (DTT), 2-merkapto-etanol vagy aszkorbinsav jelenlétében a redukált fehérjével reagálva katalizálja a természetes diszulfidkötések képződésének reakcióját vagy a diszulfidkötéseket, előnyösen nem természetes típusú diszulfidköté-

seket tartalmazó oxidált fehérjével reagálva katalizálja a természetes típusú diszulfidkötések visszaalakulását.

Ennek megfelelően molekulájában diszulfidkötéseket tartalmazó fehérje géntechnológiás előállításán, elsősorban abban az esetben, ha a rekombináns DNS-t tartalmazó gazdasejtként prokariótát, így *Escherichia coli*-t, *Bacillus subtilis*-t vagy *Bacillus brevis*-t alkalmazunk, a humán PDI-fehérje felhasználható a természetes diszulfidkötések hatékony kialakítására. A diszulfidkötéseket tartalmazó fehérje lehet citokin, így interferon- α , interferon- β , interferon- γ , interleukin-1, interleukin-2, B-sejt növekedési faktor (BGF), B-sejt differenciálódási faktor (BDF), makrofágaktiváló faktor (MAF), limfotoksin (LD), és tumornekrózis-faktor (TNF), fehérjehormon, így transzformáló növekedési faktor (TGF), eritropoietin, hámsejt növekedésfaktor (EGF), fibroblaszt növekedésfaktor (FGF), inzulin és humán növekedési hormon, patogén mikrobiológiai antigén fehérje, így hepatitis B vírus antigén, enzimek, így peptidáz és lizozim, valamint vérfehérje-komponens, így humán szérumalbumin és immunglobulin.

A fenti célból tisztított vagy részlegesen tisztított PDI-fehérjét alkalmazzuk. A felhasználás során a PDI-fehérjét közvetlenül az említett, intracellulárisan vagy extracellulárisan előállított és felhalmozott fehérjével vagy annak tisztított standard mintájával reagáltatjuk. Eljárhatunk úgy is, hogy a reakciót egy olyan transzformánsban hajtjuk végre, amelyet a kívánt fehérjét kódoló rekombináns DNS-sel és a PDI-fehérjét kódoló rekombináns DNS-sel fertőztünk.

A leírásban és a rajzokban a következő rövidítéseket alkalmazzuk:

PBS	foszfátpuffersó-oldat
DNS	dezoxiribonukleinsav
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
A	adenin
T	timin
G	guanin
C	citozin
RNS	ribonukleinsav
mRNS	messenger ribonukleinsav
dATP	dezoxi-adenozin-trifoszfát
dTTP	dezoxi-timidin-trifoszfát
dGTP	dezoxi-guanozin-trifoszfát
dCTP	dezoxi-citidin-trifoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Gly	glicin
Ala	alanin
Val	valin
Leu	leucin
Ile	izoleucin
Ser	szerin
Thr	treonin
Cys	cisztein
Met	metionin
Glu	glutaminsav
Asp	aszparaginsav
Lys	lizin

Arg	arginin
His	hisztidin
Phe	fenil-alanin
Tyr	tirozin
Trp	triptofán
Pro	prolin
Asn	aszparagin
Gln	glutamin.

A találmány szerinti PDI-fehérje aminosavszekvenciája részlegesen (legfeljebb 5%) módosítható, például más aminosavak addíciójával, aminosavak kiiktatásával és helyettesítésével.

Az ábrák ismertetése:

Az 1. ábra a 2. referenciapéldában előállított és pT3BP-1-ben és pT3BP-2-ben klónozott cDNS sematikus hasítási térképét mutatja. Az 1(1). ábrában a pT3BP-1-ben klónozott cDNS és a (2) ábrában a pT3BP-2-ben klónozott cDNS látható. Az A, E, H, P és S rövidítések jelentése rendre AatII, EcoRI, HindII, PvuII és SspI, a fekete négyzet a tisztított T3BP fehérje tripszines peptid hasításából származó aminosavszekvenciájának megfelelő szakaszt jelöli.

A 2. ábra a 2. referenciapéldában előállított és pT3BP-2-ben klónozott cDNS bázisszekvenciáját és az ennek megfelelő aminosavszekvenciát mutatja.

A 3. ábra a humán PDI aminosavszekvenciáját mutatja.

A 4. ábra az 1. példában előállított és pT3BP-3-ban klónozott cDNS sematikus hasítási térképét mutatja. A B, C, E, H és P rövidítések jelentése rendre BamHI, ClaI, EcoRI, HindIII és PstI.

Az 5. ábra az 1. példában előállított és pT3BP-3-ban klónozott cDNS bázisszekvenciáját és az ennek megfelelő aminosavszekvenciát mutatja.

A 6. ábra a humán PDI-gén állati sejtben történő kifejezésére szolgáló plazmid előállításának vázlatát mutatja.

A 7. ábra a humán PDI-génnel beoltott COS-7 sejtek által szintetizált humán PDI fluoreszcens antitestmódszerrel történő kimutatásának eredményét (fluoreszcens fotomikrográfia) mutatja. A 7. ábrában

(1) a PDI-gént tartalmazó sejt morfológiájának megfelelő fluoreszcens fotomikrográfia és

(2) a gén nélküli kontrollsejt morfológiájának megfelelő fluoreszcens fotomikrográfia eredményét mutatja.

A 8. ábra a humán PDI-gén Escherichia coli-ban történő kifejezéséhez szükséges plazmid előállításának vázlatát mutatja.

A 9. ábra az Escherichia coli-ban előállított humán PDI immunokicsapásos módszerrel felvett elúciós mintáját mutatja. Az ábrában B és D DH1/pTB766-nak és MM294/pTB766-nak, míg A és C a DH1/ptrp781-nek és MM294/ptrp781-nek felel meg.

A 10. ábra a humán PDI-gén élesztőben történő kifejezéséhez szükséges plazmid előállításának vázlatát mutatja.

A 11. ábra a PDI SDS-poliakrilamid-gélelektroforézisnek az eredményét mutatja. 1 és 2 a tisztított PDI-nek és a jelölt fehérjének felel meg.

A 12. ábra a tisztított PDI UV-abszorpciós spektrumát mutatja.

A találmány tárgyát közelebbről az alábbi példakkal mutatja be anélkül, hogy az oltalmi kör a példákra korlátozódna.

1. referenciapélda

(borjúmáj mRNS-ből származó cDNS előállítása)

Borjúmájából guanidin-iztiocianát módszerrel kivonjuk az RNS-t [Chirgwin, J. M. és munkatársai: Biochemistry, 18, 5294 (1979)]. Az RNS-ből oligo dT cellulóz oszlop-kromatográfián poli(A)-RNS-t tisztítunk [Aviv és Leder: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408 (1972)].

A poli(A)-RNS-t templátként alkalmazva cDNS-t állítunk elő Gubler, U. és Hoffmann, B. J. módszerével (Gene, 25, 263, 1983), majd a cDNS-hez EcoRI szakaszt adunk Huynh, T. V. és munkatársai módszerével [DNA Cloning I, a practical approach, 1, 49 (1985)], végül a cDNS-t λ gt 11-ben az EcoRI helyhez klónozzuk.

2. referenciapélda

(borjú PDI cDNS-t tartalmazó plazmid izolálása és bázisszekvenciájának meghatározása)

1. referenciapélda szerinti λ gt 11 cDNS-sel fertőzött Escherichia coli Y1096-ot L-tápközegű lágy agarlemezre visszük fel. A foltok megjelenése után IPTG-t (izopropil-tiogalaktozid) tartalmazó nitrocellulóz-szűrőt helyezünk a lemezre és 3 órán keresztül inkubáljuk. A nitrocellulóz-szűrőt ezután elválasztjuk és TBS-pufferral (50 mmól/l Trisz, pH=7,9, 150 mmól/l NaCl) mossuk, majd 3 tömeg%-os zselatinoldatba merítjük.

Az így kezelt nitrocellulóz-szűrőt T3 kötőfehérje elleni antitest (anti-BLT₃R) [Horiuchi, R. és Yamauchi, K.: Gunma Symposia on Endocrinology, 23, P. 149 (1986)] oldatába merítve antigén-antitest reakciónak vetjük alá. A szűrőt ezután desztillált vízzel és TBS-pufferral mossuk, és a pozitív színű λ gt 11 T3BP-1 klónok kiválogatásához szekunder antisszel kezeljük. A λ gt 11 T3BP-1-ben lévő cDNS-t EcoRI-gyel hasítjuk, majd a pUC19 plazmidban [Gene, 33, 103 (1985)] az EcoRI helyre klónozzuk és így pT3BP-1 plazmidot kapunk. Az adott plazmidban lévő cDNS-szakaszt EcoRI és PvuII restrikciós enzimekkel hasítva kapott fragmenst DNS-próbaként felhasználva átvizsgáljuk az 1. példában leírt cDNS-klóntár $5 \cdot 10^5$ klónját és így kiválasztjuk a pozitív klónokat.

Az így kapott klónok egyikéből, név szerint λ gt 11 T3BP-2-ből SacI-KpnI segítségével kihalásztuk a cDNS-t, majd a pUC19 plazmidban az SacI-KpnI helyre klónozzuk és így pT3BP-2 plazmidot kapunk. (A λ gt 11 T3BP-2-be klónozott cDNS 5' terminális EcoRI felismerőhelyét roncsoltuk.) E.coli K12 DH5 λ -t pT3BP-2 plazmiddal transzformálunk, a kapott E.coli K12 DH5 λ /pT3BP-2 transzformánsból a pT3BP-2 plazmidot extraháljuk és lúgos módszerrel [Birboim, H. C. és Doly, J.: Nucl. Acids Res., 11, 1513 (1979)] tisztítjuk. A plazmidban lévő cDNS-szakasz teljes hossza mintegy 2,8 kbp. Az 1. ábra a cDNS-szakasz vázlatos hasítási térképét mutatja.

A fenti cDNS-szakasz bázisszekvenciáját a dideoxinukleotid-lánc terminációs módszerrel [Messing, J.

és munkatársai: Nucl. Acids Res. 9, 309 (1981)] meghatározzuk. A 2. ábra a meghatározott bázisszekvenciának megfelelő aminosavszekvenciát mutatja.

A kapott polipeptid aminosavszekvenciája több, mint 90%-os homológiát mutat a patkány PDI-vel, de nem mutat homológiát tiroxinkötő globulin (TBG), tiroxinkötő prealbumin (TBPA) vagy C-erbA fehérje aminosavszekvenciájával, amelyek alkalmasak a pajzsmirigyhormon megkötésére.

A pT3BP-2 plazmidot hordozó *Escherichia coli* K12 DH5 α /pT3BP-2 IFO 14563 szám alatt az Institute for Fermentation, Osaka (IFO) és a FERM BP-1595 szám alatt a Fermentation Research Institute (FRI), Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japan helyeken van letétbe helyezve.

A pT3BP-1-ben hordozott cDNS EcoRI-PvuII fragmense előállítható úgy is, hogy a pT3BP-2-t először KpnI-gyel és SacI-gyel, majd ezután EcoRI-gyel és PvuII-vel kezeljük.

1. példa

(humán PDI cDNS-t tartalmazó plazmid izolálása és bázisszekvenciájának meghatározása)

Humán méhlepény mRNS (Toyobo Co., Ltd. Japan) alapján *Escherichia coli* Y1096 segítségével előállított λ gt 11 cDNS-tárat négy darab lágy agarlemezre viszünk fel mintegy egyszer 10^5 klón/lemez mennyiségben, és ezt nitrocellulóz-szűrőre (Millipore's HATF-szűrő) vesszük. A szűrőn lévő fágokat 0,5 n nátrium-hidroxid-oldattal roncsoljuk és a feltárt és denaturált fág DNS-t a szárítás alatt a szűrőn immobilizáljuk (Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 320, 1982). Ettől külön a 2. referenciapélda szerinti pT3BP-1 plazmidban található cDNS-szakasz EcoRI és PvuII restrikciós enzimmel történő hasításával kapott DNS-fragmenst a Nick-transzlációs módszerrel (Maniatis és munkatársai idézett műve, 109) 32 P-ral megjelöljük.

A hibridizációs reakciót a jelzett minta és a DNS-immobilizált szűrő között 42 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül végezzük egy 10 ml-es elegyben, amely a jelzett minta mellett 5•SSPE-t (0,9 mól/l NaCl, 50 mmól/l nátrium-foszfát-puffer, pH=7,4, 5 mmól/l EDTA), 50 tömeg% formamidot, 5•Denhardt-oldatot, 0,1 tömeg% SDS-t és 100 mikrogramm/ml denaturált lazacsperma DNS-t tartalmaz. A reakció után a szűrőt kétszer 2•SSC-0,1 tömeg% SDS-oldattal (1•SSC=0,15 mól/l NaCl és 0,015 mól/l nátrium-citrát) szobahőmérsékleten 30 percen keresztül mossuk, majd kétszer 1•SSC-0,1 tömeg% SDS-oldattal 68 °C hőmérsékleten 30 percen keresztül tovább mossuk. A kimosott szűrő megszáradása után felvesszük a radioautogrammot, és megjelöltük a mintával reagált klónokat. Az így kapott klónból, vagyis a λ gt 11 T3BP-3 klónból Davis és munkatársai módszerével (Davis és munkatársai: Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980) extraháljuk a fág DNS-t.

A λ gt 11 T3BP-3-at EcoRI segítségével 50 mmól/l NaCl, 100 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 7 mmól/l

MgCl₂ és 7 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül emésztjük és az agarózgél-elektroforézissel kapott cDNS-t a pUC19 plazmidban az EcoRI helyre klónozzuk T4 DNS-ligáz segítségével 50 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 10 mmól/l MgCl₂, 20 mmól/l ditiotretitol és 1 mmól/l ATP összetételű pufferben 16 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül, melynek során pT3BP-3 plazmidot kapunk. *E. coli* K12 DH5 α törzset transzformálunk a pT3BP-3 plazmiddal 50 mmól/l CaCl₂ jelenlétében 0 °C hőmérsékleten 20 perc alatt, majd a sejteket 45 másodpercen keresztül 42 °C hőmérsékleten hőkezeljük. A kapott transzformánsból, vagyis az *E. coli* 112 DH5 α /pT3BP-3-ből a lúgos extrakciós módszerrel [Birnboim, H. C. és Doly, J.: Nucl. Acids Res. 11, 1513 (1979)] extraháljuk, és megtisztítjuk a pT3BP-3 plazmidot. A plazmidban lévő cDNS-szakasz teljes hossza mintegy 2,4 kbp. A 4. ábra a cDNS-szakasz vázlatos hasítási térképét mutatja.

A fenti cDNS-szakasz bázisszekvenciáját didezoxinukleotid-lánc terminációs módszerrel (Messing, J. és munkatársai: Nuc. Acids Res. 9, 309, 1981) határozzuk meg. Az 5. ábra a meghatározott bázisszekvenciából levezetett aminosavszekvenciát mutatja.

A polipeptid aminosavszekvenciája több, mint 90%-os homológiát mutat a patkány PDI-vel, de semmilyen hasonlóságot nem mutat a tiroxinkötő globulin (TBG), a tiroxinkötő prealbumin (TBPA) vagy C-erbA fehérje aminosavszekvenciájával, amelyek képesek a pajzsmirigyhormon megkötésére.

A pT3BP-3 plazmidot hordozó *Escherichia coli* K12 DH5 α törzset (*Escherichia coli* K12 DH5 α /pT3BP-3) IFO 14610 szám alatt az IFO-nál és FERM BP-1841 szám alatt (a FERM P-9386 számból átalakítva) az FRI-nél deponáltuk.

2. példa

(állati sejtekhez alkalmazható kifejező plazmid előállítás)

A pT3BP-3 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel kezeljük 50 mmól/l NaCl, 100 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5) 7 mmól/l MgCl₂ és 7 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, és így 25 kbp nagyságú cDNS-t (4. ábra) különítünk el. Ettől külön a 63 282/1986. számú japán közrebocsátási iratban ismertetett pTB106 plazmidban lévő interleukin-2 génszakasz 5' végén lévő PstI hasítási hely és 3' végén lévő BamHI hasítási hely átalakításával és az interleukin-2 génszakasz kiiktatásával kapott pTB389 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel kezeljük 50 mmól/l NaCl, 100 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 7 mmól/l MgCl₂ és 7 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, majd az 5' végén lévő foszfátcsoportot bakteriális lúgos foszfáttal 1 mól/l Trisz-HCl (pH=8,0) és 1 mmól/l MgSO₄ összetételű pufferben 25 °C hőmérsékleten 30 perc alatt lehasítjuk. A kapott fragmenst és a fenti cDNS-t összekeverjük és T4 DNS-ligázzal 50 mmól/l Trisz-HCl

(pH=7,9), 10 mmól/l $MgCl_2$, 20 mmól/l ditiotreitol és 1 mmól/l ATP összetételű pufferben 16 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül ligáljuk. Így pTB745 plazmidot (6. ábra) kapunk.

3. példa

(humán PDI-t kódoló gén kifejezése állati sejtben)

Majom COS-7 sejteket kitenyésztünk egyrétegű tenyészet formájában 10 tömeg% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM-közegben, majd a közeget azonos friss közegre cseréljük. 4 órával a közeg kicserélése után 10 μg pTB745 plazmid DNS-t tartalmazó kalcium-foszfát-gélt állítunk elő a szokásos módon (Graham és munkatársai: Virology 59, 466, 1973), és a tenyészethez adjuk. Így pTB745-tel fertőzött COS-7 sejteket kapunk. További 4 óra elteltével a sejteket glicerinnel kezeljük, és a pTB745-tel fertőzött COS-7 sejteket 0,5 tömeg% magzati borjúsérumot tartalmazó közegben továbbtenyésztjük.

48 óra elteltével a pTB745-tel fertőzött COS-7 sejteket 3,5 tömeg% formalint tartalmazó PBS segítségével szobahőmérsékleten 15 percen keresztül fixáljuk, majd 0,1 tömeg% szaponint tartalmazó PBS segítségével szobahőmérsékleten 10 percen keresztül kezeljük, és 4 °C hőmérsékleten 2 órán keresztül antiborjú T3BP nyúlantitesttel reagáltatjuk. A reagálatlan antitestek PBS-sel történő alapos kimosása után a sejteket egy éjszakán keresztül FITC jelölésű antinyúl IgG juhantitesttel reagáltatjuk, és a sejteket fluoreszcencia mikroszkóp segítségével figyeljük. Az eredményeket a 7. ábra tartalmazza. A kontroll COS-sejtekhez viszonyítva lényegesen nagyobb fluoreszcencia figyelhető meg azokban a sejtekben, amelyekbe humán PDI-gént ültettünk, ez arra utal, hogy a COS-sejtekben humán PDI-fehérje szintetizálódott.

4. példa

(humán PDI-gén Escherichia coli-ban történő kifejezéséhez szükséges plazmid előállítás)

Az 1. példa szerint előállított és humán PDI cDNS-t tartalmazó pT3BP-3 plazmidot *Ava*I restrikciós enzimmel kezeljük 6 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 60 mmól/l NaCl, 10 mmól/l $MgCl_2$ és 6 mmól/l 2-merkapto-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 16 percen keresztül, és így 0,85 kbp nagyságú DNS-fragmentet kapunk, amely tartalmazza a humán PDI-t kódoló szakasz első felét. Ezt a DNS-fragmentet 10 mmól/l Trisz-HCl (pH=8,0), 5 mmól/l $MgCl_2$, 33 μ mol/l dATP, 33 μ mol/l dCTP, 33 μ mol/l dGTP és 33 μ mol/l dTTP összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 30 percen keresztül DNS-polimerázzal (Klenow-fragmens) reagáltatjuk és így az *Ava*I hasítási helyet tompa véggé alakítjuk. Ezt a DNS-fragmentet T4 DNS-ligáz jelenlétében 50 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 10 mmól/l $MgCl_2$, 20 mmól/l ditiotreitol és 1 mmól/l ATP összetételű pufferben 16 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül foszforilezett szintetikus oligonukleotidokkal (5' AATTCTATGGCGC 3' és 5' GCGCCATAG 3') ligáljuk, majd *Eco*RI restrikciós enzimmel kezeljük 50 mmól/l NaCl, 100 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 7 mmól/l $MgCl_2$ és 7 mmól/l 2-merkapto-etanol

összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, végül *Cla*I restrikciós enzimmel kezeljük 10 mmól/l Trisz-HCl (pH=8,0), 7 mmól/l $MgCl_2$, 50 mmól/l NaCl és 0,01% borjúsérum-albumin összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül. Így 0,49 kbp méretű DNS-fragmentet kapunk. Ettől külön a pT3BP-3 plazmidot *Cla*I restrikciós enzimmel kezeljük 10 mmól/l Trisz-HCl (pH=8,0), 7 mmól/l $MgCl_2$, 50 mmól/l NaCl és 0,01% borjúsérum-albumin összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, majd *Pst*I restrikciós enzimmel kezeljük 150 mmól/l NaCl, 20 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5) és 10 mmól/l $MgCl_2$ összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, és így 1,47 kbp nagyságú DNS-fragmentet kapunk, amely tartalmazza a PDI-t kódoló szakasz második felét. A TRP-promotort tartalmazó ptp 781 plazmid DNS-ét (Kurookawa, T. és munkatársai: Nucl. Acids Res., 11, 3077-3085, 1983) *Eco*RI restrikciós enzimmel kezeljük 50 mmól/l NaCl, 100 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 7 mmól/l $MgCl_2$ és 7 mmól/l 2-merkapto-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, majd *Pst*I restrikciós enzimmel kezeljük 150 mmól/l NaCl, 20 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5) és 10 mmól/l $MgCl_2$ összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, és mintegy 3,2 kbp méretű DNS-fragmentet izolálunk, amely tartalmazza a trp-promotort, a tetraciklin-rezisztenciagént és a replikációs origót. Ezt a 3,2 kbp méretű *Eco*RI-*Pst*I DNS-fragmentet az említett 0,49 kbp méretű *Eco*RI-*Cla*I DNS-fragmenttel, amely tartalmazza a humán PDI-t kódoló gént, és az 1,47 kbp méretű *Cla*I-*Pst*I DNS-fragmenttel ligáljuk T4 DNS-ligáz segítségével 50 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 10 mmól/l $MgCl_2$, 20 mmól/l ditiotreitol és 1 mmól/l ATP összetételű pufferben 16 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül, amelynek során humán PDI-t kifejező pTB766 plazmidot (8. ábra) kapunk. *Escherichia coli* K12 DH1 és MM294 törzseket transzformálunk a kapott plazmiddal 50 mmól/l $CaCl_2$ jelenlétében 0 °C hőmérsékleten 20 percen keresztül, majd a sejteket 45 másodpercen keresztül 42 °C hőmérsékleten hőkezeljük, amelynek során pTB766 plazmidot hordozó transzformánsokat, nevezetesen *Escherichia coli* K12 DH1/pTB766-ot és MM294/pTB766-ot kapunk.

A pTB766 plazmidot hordozó *Escherichia coli* K12 MM294 törzset (*Escherichia coli* MM294/pTB766) IFO 14611 szám alatt az IFO-nál és FERM BP-1842 szám alatt (a FERM P-9391 számból) az FRI-nél deponáltuk. A ptp 781 plazmidot hordozó *Escherichia coli* K12 DH1 törzset (*Escherichia coli* DH1/ptp 781) IFO 14546 szám alatt az IFO-nál és FERM BP-1591 szám alatt (a FERM P-9055 számból) az FRI-nél deponáltuk.

5. példa

(*Escherichia coli* ^{35}S -metioninnal történő jelölése és immunkicsapásos reakciója)

A pTB766 plazmidot hordozó *Escherichia coli* MM294 vagy DH1 törzset 8 $\mu g/ml$ tetraciklint, 0,2 tömeg% kazaminosavat és 1 tömeg% glükózt tartalmazó M9 tápközegben 37 °C hőmérsékleten tenyésztjük. Miután a tenyészet zavarossága Klett-Summerson fotoe-

lektrikus koloriméterrel (Klett MFG. Co. Inc., USA) 54. számú filteren keresztül mérve elérte a 200-as szintet, 25 µg/ml koncentrációban IAA-t (3β-indolil-akril-sav) adunk hozzá. 2 óra elteltével 15 µCi/ml aktivitásig ³⁵S-metionint adagolunk, és a következő 30 perc alatt jelöljük a szintetizált fehérjét. A jelölés után a sejteket összegyűjtjük és a tenyészközeg egyötöd térfogatának megfelelő mennyiségű 10 mmól/l Trisz-HCl-oldatban (pH=8,0) 0,15 mól/l nátrium-klorid-oldattal és 10 tömeg% szacharózoldattal mossuk. A szuszpenzióhoz 1 mmól/l fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF), 0,2 mól/l nátrium-kloridot, 10 mmól/l EDTA-t és 150 mikrogramm/ml lizozimot adunk. Az elegyet 0 °C hőmérsékleten egy órán keresztül reagáltatjuk, majd 31 °C hőmérsékleten 2 percen keresztül melegítjük és rövid ideig (mintegy 10 másodperc) ultrahanggal kezeljük. A terméket centrifugálva sejtextraktumot kapunk. A sejtextraktumhoz antiborjú T3BP nyúlantitestet (Horiuchi, R. és Yamauchi, K.: Gunma Symposia on Endocrinology, 23, 149, 1986) adunk és 4 °C hőmérsékleten egy éjszakán keresztül reagáltatjuk. Ezután *Staphylococcus* sejteket (A fehérje) adunk hozzá és a teljes elegyet 0 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül állni hagyjuk. Ez idő alatt az antigén-antitest konjugátum a sejtekhez kötődik. A sejteket centrifugálással 5 mmól/l EDTA, 150 mmól/l nátrium-klorid, 0,05 tömeg% Nonidet P-40 (Shell Oil) és 1 mg/ml ovalbumin 50 mmól/l Trisz-HCl-ben (pH=7,4) felvett oldatával ismételt mossuk, majd 100 °C hőmérsékleten 5 percen keresztül elektroforézisminta előállításához alkalmazott oldattal (2 tömeg% SDS, 5 tömeg% 2-merkaptó-etanol, 0,001 tömeg% bróm-fenol-kék és 10 tömeg% glicerol 0,0625 mól/l Trisz-HCl-ban, pH=6,8) kezelve eluáljuk a konjugátumot. A kapott immunocsapadékot 10–20% gradiensű SDS-poliakrilamidgél elektroforézissel analizáljuk. Az elektroforézis után a gél 5 tömeg%-os triklór-ecetsav-oldattal fixáljuk és fluorográfiás módszerrel radioautogramot veszünk fel. A 9. ábrán mutatott eredményekből látható, hogy a kívánt méretű (mintegy 60 kD) PDI-t mindkét kifejező plazmidot hordozó törzs, vagyis az *Escherichia coli* DH1/pTB766 és MM294/pTB766 törzs szintetizálta.

6. példa

(humán PDI-gén élesztőben történő kifejezéséhez szükséges plazmid előállítása)

Az 1. példa szerint előállított és humán PDI cDNS-t tartalmazó pT3BP-3 plazmidot SacI restrikciós enzimmel kezeljük 6 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 6 mmól/l MgCl₂ és 6 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, és T4 DNS-polimerázzal reagáltatva tompa végűvé alakítjuk. A kapott hasítási termékhez GGTCGACC szekvenciájú SalI linkert kapcsolunk T4 DNS-ligáz segítségével 50 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 10 mmól/l MgCl₂, 20 mmól/l ditiotritol és 1 mmól/l ATP összetételű pufferben 16 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül. A ligált terméket SalI restrikciós enzimmel kezeljük 150 mmól/l NaCl, 6 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 6 mmól/l MgCl₂ és 6 mmól/l

2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, majd ClaI restrikciós enzimmel kezeljük 10 mmól/l Trisz-HCl (pH=8,0), 7 mmól/l MgCl₂, 50 mmól/l NaCl és 0,01% borjúsérum-albumin összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, és így 0,65 kbp nagyságú DNS-fragmenst kapunk. A 2. példa szerinti pTB745 plazmid DNS-ét ScaI restrikciós enzimmel kezeljük 100 mmól/l NaCl, 6 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 6 mmól/l MgCl₂ és 6 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, majd ClaI restrikciós enzimmel kezeljük 10 mmól/l Trisz-HCl (pH=8,0), 7 mmól/l MgCl₂, 50 mmól/l NaCl és 0,01% borjúsérum-albumin összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, és így 3,8 kbp nagyságú DNS-fragmenst kapunk. A pGLD906 plazmid (Biochem. Biophys. Res. Commun., 138, 268, 1986) DNS-ét SalI restrikciós enzimmel kezeljük 150 mmól/l NaCl, 6 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 6 mmól/l MgCl₂ és 6 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül, majd ScaI restrikciós enzimmel kezeljük 100 mmól/l NaCl, 6 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,5), 6 mmól/l MgCl₂ és 6 mmól/l 2-merkaptó-etanol összetételű pufferben 37 °C hőmérsékleten 60 percen keresztül és így 6,2 kbp nagyságú DNS-fragmenst kapunk. Ezt a DNS-fragmenst a fent említett két DNS-fragmenssel ligáljuk T4 DNS-ligáz segítségével 50 mmól/l Trisz-HCl (pH=7,9), 10 mmól/l MgCl₂, 20 mmól/l ditiotritol és 1 mmól/l ATP összetételű pufferben 16 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül, amelynek során az élesztőben történő kifejezéshez alkalmas pTB767 plazmidot kapjuk (10. ábra). Az AH22R⁻ törzset a fenti plazmiddal transzformáljuk 50 mmól/l CaCl₂ jelenlétében 0 °C hőmérsékleten 20 percen keresztül, majd a sejteket 45 másodpercen keresztül 42 °C hőmérsékleten hőkezeljük. Így pTB767 plazmidot hordozó élesztő-törzset vagyis *Saccharomyces cerevisiae* AH22R⁻/pTB767 törzset kapunk.

A pTB767 plazmidot hordozó *Saccharomyces cerevisiae* AH22R⁻ törzset (*Saccharomyces cerevisiae* AH22R⁻/pTB767) IFO 10425 szám alatt az IFO-nál és FERM BP-1843 szám alatt (a FERM P-9603 számból) az FRI-nél deponáltuk.

7. példa

(élesztő jelölése ³⁵S-metioninnal és immunkicsapásos reakciója)

A pTB767 plazmidot hordozó AH22R⁻ élesztőtörzset alacsony Pi-tartalmú közegben (Biochem. Biophys., Res. Commun. 138, 268, 1986) tenyésztjük 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán keresztül, majd a szintetizált fehérje megjelöléséhez 20 mikroCi/ml ³⁵S-metionint adagolunk. A jelölés után a sejteket összegyűjtjük és 0,15 mól/l nátrium-kloriddal mossuk és a tenyészközeg egyötöd térfogatát kitevő 7 mól/l guanidin- hidrokloridot adunk hozzá. A sejteket 0 °C hőmérsékleten egy órán keresztül ronszoljuk, majd 10 000 fordulatszámnál 10 percen keresztül centrifugáljuk. A felülúszót 10 mmól/l Trisz-HCl-t

(pH=8,0), 1 mmól/l EDTA-t, 200 mmól/l nátrium-kloridot és 1 mmól/l PMSF-et tartalmazó oldattal szemben dializáljuk. Ehhez a sejtextraktumhoz antiborjú T3BP nyúlantitestet (lásd az 5. példát) adunk és az 5. példában leírt módon immuncsapadékot nyerünk, amelyet SDS-poliakrilamidgél elektroforézissel és radioautográfiásan analizálunk. Az eredmények szerint a kifejező plazmidot hordozó AH22R/pTB767 élesztőtörzs specifikus polipeptidet szintetizált, vagyis a humán PDI-élesztőben is előállítható.

Az alkalmazott alacsony Pi-tartalmú tápközeget összetétele 1 literre számolva:

KCl	1,5 g
Glükóz	20 g
Aszparagin	2 g
L-hisztidin	100 mg
KI (1 mg/ml)	100 mikroliter
MgSO ₄ ·7H ₂ O (500 mg/10 ml)	10 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (330 mg/10 ml)	10 ml
Nyomelemoldat (a)	1 ml
Vitaminoldat (b)	1 ml

Nyomelemoldat (a) összetétele 1 literre számolva:

CuSO ₄ ·5H ₂ O	40 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	250 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	40 mg
(NH ₄) ₂ PO ₄ ·12MoO ₃ ·3H ₂ O	20 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	310 mg.

Vitaminoldat (b) összetétele 1 literre számolva:

Inozitol	10 g
Tiamin	200 mg
Piridoxin	200 mg
Kalcium-pantotenát	200 mg
Niacin	200 mg
Biotin	2 mg.

8. példa

(Escherichia coli MM294/pTB766 törzsből származó PDI tisztítása)

A pTB766 kifejező plazmidot tartalmazó Escherichia coli MM294 törzset (4. példa) 1 liter tápközeget 37 °C hőmérsékleten 11 órán keresztül tenyésztjük, ahol a tápközeget 5 mg/l tetraciklint, 10 g/l Bactotripton, 5 g/l Bacto-élesztőextraktumot és 5 g/l nátrium-kloridot tartalmaz. A tenyészetet 20 liter M9 közegbe visszük, amely 2 mg/l B1-vitamint, 10 g/l glükózt és 10 g/l kazaminoavat tartalmaz, és kevertetés és levegőztetés közben 37 °C hőmérsékleten további 9 órán keresztül tenyésztjük. Ezután a sejteket (385 g nedves tömeg) centrifugálással összegyűjtjük és felhasználásig -80 °C hőmérsékleten tároljuk.

A sejteket (30 g nedves tömeg) 150 ml 20 mmól/l Trisz-HCl-pufferben (pH=7,4) szuszpendáljuk, amely 0,15 mól/l nátrium-kloridot, 10 mmól/l EDTA-t, 10 mmól/l PMSF-et és 0,1 mmól/l (p-amidino-fenil)-metánszulfonil-fluorid HCl (APMSF) tartalmaz. A szuszpenziót 0 °C hőmérsékleten négyszer 1 percen keresztül ultrahanggal besugározzuk, majd centrifugáljuk. Így 156 ml nyers extraktumot kapunk.

A nyers extraktumot Cellulofine GCL-2000-SF oszlopra (Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Tokió, Japán) (6×102 cm, 2880 ml) visszük, amelyet előzőleg 0,15 mól/l nátrium-kloridot, 1 mmól/l kalcium-kloridot és 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmazó 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferral (pH=6,8) egyenlítettünk ki. Az oszlopot a fenti pufferral eluáljuk és a PDI-t tartalmazó eluátumot (325 ml) összegyűjtjük.

Az így kapott eluátumot hidroxipatit-oszlopra (Biorad., California, USA) (1,5×14 cm, 25 ml) visszük, amelyet előzőleg 0,145 mól/l nátrium-kloridot, 1 mmól/l kalcium-kloridot és 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmazó 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferrel (pH=6,8) egyenlítettünk ki. Az oszlopot a fenti pufferral mossuk és lineárisan változó nátrium-foszfát koncentrációval eluáljuk. Ehhez 200 ml 300 mmól/l nátrium-foszfát-puffert (pH=6,8) adunk 200 ml 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferhez (pH=6,8). A PDI-t tartalmazó eluátumokat összegyűjtjük.

Az eluátumokat egy éjszakán keresztül 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmazó 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferral (pH=6,8) szemben dializáljuk. A dializált oldatot DEAE-Toyopearl oszlopra (Tosoh, Tokió, Japán) (1,5×15 cm, 26,5 ml) visszük, amelyet előzőleg a fenti pufferral egyenlítettünk ki. Az oszlopot a fenti pufferral mossuk és lineárisan változó nátrium-klorid koncentrációval eluáljuk. Ehhez 200 ml 10 mmól/l nátrium-foszfát-puffert (pH=6,8), amely 0,5 mól/l nátrium-kloridot és 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmaz, adunk 200 ml 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferhez (pH=6,8), amely 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmaz. A PDI-t tartalmazó eluátumokat összegyűjtjük. A PDI-t tartalmazó frakciókat 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmazó 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferrel (pH=6,8) szemben dializáljuk. A dializált oldatot DEAE-NPR HPLC-oszlopra (Tosoh, Tokió, Japán) (0,46×3,5 cm) visszük, amelyet előzőleg 0,09 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferral (pH=6,8) egyenlítettünk ki. A fehérjét 0,09 mól/l és 0,39 mól/l közötti változó nátrium-klorid koncentrációban eluáljuk 30 perc alatt. A PDI-t tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és szűréssel sterilizáljuk. Fehérjekoncentráció 106 mikrogramm/ml, összterfogat 17,1 ml, összfehérje 1,8 mg.

A kapott készítmény SDS-poliakrilamidgél elektroforézis szerint homogén (11. ábra).

9. példa

(Escherichia coli MM294/pTB766 törzsszel

előállított PDI tisztításának alternatív módszere)

A 8. példa szerint előállított 30 g E.coli sejtet 160 ml 20 mmól/l Trisz-HCl-pufferben (pH=7,4) szuszpendálunk, amely 0,15 mól/l nátrium-kloridot, 10 mmól/l EDTA-t, 1 mmól/l PMSF-et és 0,1 mmól/l APMSF-et tartalmaz. A sejteket 0,25–0,5 mm átmérőjű üvegyöngőkkel 0 °C hőmérsékleten 30 percen keresztül roncsozzuk. A szuszpenziót centrifugáljuk és a felülúszót (84 ml) összegyűjtjük.

A felülúszót a 8. példában leírt módon tisztítva homogén PDI-készítményt kapunk. Fehérjekoncent-

ráció 111 mikrogramm/ml, összterfogat 9,0 ml, összfehérje 1,0 mg.

10. példa

(PDI peptidkémiai jellemzése)

A 8. példában előállított PDI-preparátummal a következő peptidkémiai analíziseket végezzük el.

(1) Móltömeg-meghatározás

A PDI-t redukáló körülmények között SDS-poliakrilamidgél elektroforézisének (Nature, 227, 680, 1970) vetjük alá és a fehérjét Coomassie Brilliant Blue R-250 segítségével megfestjük. A PDI egyetlen sávot mutat, amelynek móltömege mintegy 55 000 (11. ábra).

(2) Aminosav-összetétel meghatározása

Az aminosav-összetételt 6 n sósavban 110 °C hőmérsékleten 4 tömeg% tioglikolsav jelenlétében 24, 48 és 72 órán keresztül végzett hidrolízis alapján határozzuk meg. Az aminosav-analízist ninhidrin módszerrel Hitachi Amino acid analyzer model 835 berendezésén végezzük. A Ser és Thr értékeket a 0 idejű hidrolízisnek megfelelő extrapolálással, és a H-Cys értéket (fél cisztein) ciszteinsavként perhangyasavas oxidálás után végzett 24 órás hidrolízis alapján határozzuk meg. A mért aminosav-összetételt megfelel annak, amely a cDNS-bázisszekvencia alapján következtethető volt. Az eredményeket a 2. táblázat mutatja.

Aminosav	A maradékok száma molekulánként	A cDNS-szekvencia alapján számolható érték
Asp/Asn	54,4	57
Thr	21,8	23
Ser	21,2	23
Glu/Gln	70,7	69
Pro	20,5	21
Gly	29,5	29
Ala	46,6	44
H-Cys	5,5	6
Val	31,1	29
Met	4,5	5
Ile	21,5	23
Leu	41,5	41
Tyr	11,9	12
Phe	34,0	33
Lys	46,6	47
His	11,7	11
Arg	13,6	13
Trp	4,5	5

(3) N-terminális aminosavszekvencia meghatározása

102 mikrogramm (1,85 nmól) PDI-szekvencia analízisét gázfázisú fehérjeszekvenciában (model 470A, Applied Biosystems, California, USA) végezzük. A fenil-tio-hidantion (PTH) aminosavat HPLC segítségével Micropak SP-ODS oszlopon (Varian, USA) határozzuk meg.

A 3. táblázatban megadott mért szekvencia 20 cikluson keresztül azonos volt a cDNS-ből levezethető

szekvenciával. A 8. és 13. számú maradékot nem határoztuk meg.

	Meghatározott PTH-aminosav			
	Ciklus	Maradék	pmól	A cDNS-szekvenciából levezethető aminosav
5	1	Met	373	(Met)
10	2	Ala	720	Ala
	3	Pro	277	Pro
	4	Glu	319	Glu
	5	Glu	379	Glu
	6	Glu	353	Glu
15	7	Asp	303	Asp
	8	–	–	His
	9	Val	271	Val
	10	Leu	581	Leu
20	11	Val	333	Val
	12	Leu	638	Leu
	13	–	–	Arg
	14	Lys	227	Lys
	15	Ser	92	Ser
25	16	Asn	257	Asn
	17	Phe	330	Phe
	18	Ala	615	Ala
	19	Glu	334	Glu
	20	Ala	669	Ala

(4) C-terminális aminosav

151 mikrogramm (2,75 nmól) PDI C-terminális aminosavját hidrazinolízissel (J. Biochem. 59, 170, 1966) lehasítjuk, majd aminosav-analízissel meghatározzuk. A C-terminális aminosav a mérés szerint leucin, a feltárás 46%-os.

(5) UV-abszorpciós spektrum

A PDI UV-abszorpciós spektruma 10 mmól/l nátrium-foszfát-pufferben (pH=6,8) felvéve 280 nm-nél mutat abszorpciós csúcsot (12. ábra).

40

11. példa

(feltekerített ribonukleáz, RNáz kibontása PDI-vel)

A 8. példában előállított homogén PDI-készítmény enzimaktivitását feltekerített RNáz kioldásában mérjük ditiotritol (DTT) jelenlétében. A feltekerített RNáz-t Hillson és munkatársai módszerével (Methods in Enzymology, 107, 281–284, 1984) állítjuk elő borjúhasnyál-mirigy RNáz-ból kiindulva.

Az RNáz aktivitását Kalnisky és munkatársai módszerével (J. Biol. Chem. 234, 1512–1516, 1959) határozzuk meg, szubsztátumként élesztő poli-RNS-t alkalmazva.

A vizsgálathoz alkalmazott A puffer összetétele 100 mmól/l nátrium-foszfát-puffer (pH=7,8), amely 10 mmól/l EDTA-t tartalmaz, a B puffer összetétele 0,2 mól/l nátrium-acetát-puffer (pH=5,0), a C puffer összetétele 0,1 mól/l nátrium-acetát-puffer (pH=5,0).

10 mikroliter PDI-t (111 mikrogramm/l), 168 mikroliter A puffert és 2 mikroliter 1 mmól/l DDT-t tartalmazó mérőcsövet 30 °C hőmérsékletű vízfürdőbe he-

lyeüzünk és 5 percen keresztül előinkubáljuk. A mérőcsőhöz 20 mikroliter 0,5 mg/ml feltekerített RNáz-t adunk és az egész reakcióelegyet 30 °C hőmérsékleten tartjuk 60 percen keresztül. A reakciót 800 mikroliter B puffer adagolásával állítjuk le.

A reakcióelegyben lévő kibontott és aktív RNáz-t az alábbi módon határozzuk meg:

200 mikroliter reakcióelegyet centrifugacsőbe öntünk és 5 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten előinkubáljuk. A centrifugacsőben lévő reakcióelegyhez 5 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten előinkubált 200 mikroliter 1 tömeg%-os élesztő poli-RNS-t adunk és az egész reakcióelegyet 4 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten tartjuk. 200 mikroliter 25 tömeg%-os perklorásvoldatot adunk hozzá, amely 0,75 tömeg% uránium-acetátot tartalmaz, és a teljes reakcióelegyet jeges-vizes fürdőben 5 percen keresztül inkubáljuk, majd 16 000 fordulatonál 5 percen keresztül centrifugáljuk. A felülúszót desztillált vízzel 30-szorosára hígítjuk és meghatározzuk a 260 nm-nél mérhető abszorpciót.

A PDI $1 \cdot 10^{-5}$ mól/l DTT jelenlétében kioldja a feltekerített RNáz-t. A feltekerített RNáz mintegy 25%-a aktív és kioldott RNáz-zá alakult a megadott körülmények között (4. táblázat).

Adalék	RNáz-aktivitás (%)
nincs	0,9
PDI	0,9
DTT	4,4
PDI+DTT	24,9

12. példa

(feltekerített rekombináns interleukin-2, rIL-2, kioldása PDI-vel)

8. példa szerinti PDI-t adunk feltekerített rIL-2 oldathoz és a feltekerített rIL-2 kioldását az IL-2 aktivitás növekedésében határoztuk meg.

Feltekerített rIL-2-t állítunk elő Brawning és munkatársai módszerével (Anal. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130, 692–699, 1985) kiindulva. Ismert, hogy a feltekerített rIL-2 alacsony biológiai aktivitást mutat (Brawning és munkatársai: Anal. Biochem. 155, 123–128, 1986).

Az IL-2 biológiai aktivitását módosított MTT-módszerrel NK3C3 egérsejteken határozzuk meg (Tada és munkatársai: J. Immunol. Methods, 93, 157–165, 1986).

150 mikroliter 200 mikrogramm/ml feltekerített rIL-2-t adunk mérőcsövekhez, amelyek különböző mennyiségű PDI-t (végső koncentráció 0, 0,74, 1,85 és 3,70 mikrogramm/ml) 1000 mikroliter 30 mmól/l Trisz-acetát-puffert (pH=9,0), 30 mikroliter 1 mmól/l DTT-t és 2850 mikroliter végső térfogatig szükséges desztillált vizet tartalmaznak. A teljes reakcióelegyet 18 órán keresztül 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Az IL-2 aktivitást a módosított MTT-módszerrel határozzuk meg minden mérési csőnél.

A natív rIL-2 a PDI-koncentráció növekedésével együtt növekszik (5. táblázat).

	PDI-koncentráció (mikrogramm/ml)	aktív IL-2 koncentráció (mikrogramm/ml)
5	0	1,28
	0,74	2,37
10	1,85	2,77
	3,70	3,02

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- Eljárás a 3. ábra szerinti aminosavszekvenciájú polipeptid előállítására, ahol az ábrán
Z jelentése Ala vagy MetAla,
X jelentése Ala vagy Pro,
- azzal jellemezve, hogy a tárgyi kör szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó replikálható vektorral transzformált mikroorganizmust tenyésztünk, a tenyészetben a polipeptidet felhalmozzuk és kinyerjük. (Elsőbbsége: 1987. 10. 05.)
- Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy mikroorganizmusként Escherichia coli-t tenyésztünk. (Elsőbbsége: 1987. 10. 05.)
- Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan, 3. ábra szerinti aminosavszekvenciájú polipeptid előállítására, ahol
Z jelentése MetAla,
X jelentése Ala vagy Pro,
- azzal jellemezve, hogy a tárgyi kör szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó replikálható vektorral transzformált mikroorganizmust tenyésztünk, a tenyészetben a polipeptidet felhalmozzuk és kinyerjük. (Elsőbbsége: 1987. 10. 05.)
- Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy transzformált mikroorganizmusként Saccharomyces cerevisiae AH22R/pTB767 törzset (IFO 10425, FERM BP-1873) tenyésztünk. (Elsőbbsége: 1987. 09. 18.)
- Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan, 3. ábra szerinti aminosavszekvenciájú polipeptid előállítására, ahol
Z jelentése Ala vagy MetAla,
X jelentése Ala,
- azzal jellemezve, hogy a tárgyi kör szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó replikálható vektorral transzformált mikroorganizmust tenyésztünk, a tenyészetben a polipeptidet felhalmozzuk és kinyerjük. (Elsőbbsége: 1987. 06. 01.)
- Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy transzformált mikroorganizmusként Escherichia coli MM294/pTB766 törzset (IFO 14611, FERM BP-1842) tenyésztünk. (Elsőbbsége: 1987. 06. 01.)
- Eljárás 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó replikálható vektorral transzformált mikroorganizmus előállítására, ahol az ábrán

Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala vagy Pro,

azzal jellemezve, hogy a mikroorganizmust a tárgyi kör szerinti vektorral transzformáljuk. (Elsőbbsége: 1987. 10. 05.)

8. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan, 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó replikálható vektorral transzformált mikroorganizmus előállítására, ahol

Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala,

azzal jellemezve, hogy a mikroorganizmust a tárgyi kör szerinti vektorral transzformáljuk. (Elsőbbsége: 1987. 06. 01.)

9. Eljárás 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát hordozó és mikroorganizmusban replikálható vektor előállítására, ahol az ábrán

Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala vagy Pro,

azzal jellemezve, hogy a 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát tartalmazó DNS-t viszünk be egy mikroorganizmusban replikálható vektorba. (Elsőbbsége: 1987. 10. 05.)

10. A 9. igénypont szerinti eljárás olyan, 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát kódoló bázisszekvenciát

hordozó és mikroorganizmusban replikálható vektor előállítására, ahol

Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala,

5 *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő DNS-t visszük be a mikroorganizmusban replikálható vektorba. (Elsőbbsége: 1987. 06. 01.)

11. Eljárás eukariótaszervezet természetes típusú diszulfidkötést tartalmazó fehérjéjének előállítására,
10 *azzal jellemezve*, hogy az eukariótaszervezet prokariótasejt által előállított fehérjéjét 1. igénypont szerint előállított, 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát tartalmazó polipeptiddel reagáltatjuk, ahol az ábrán

Z jelentése Ala vagy MetAla,

15 X jelentése Ala vagy Pro.

(Elsőbbsége: 1987. 10. 05.)

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan 3. ábra szerinti aminosavszekvenciát tartalmazó polipeptidet alkalmazunk, ahol

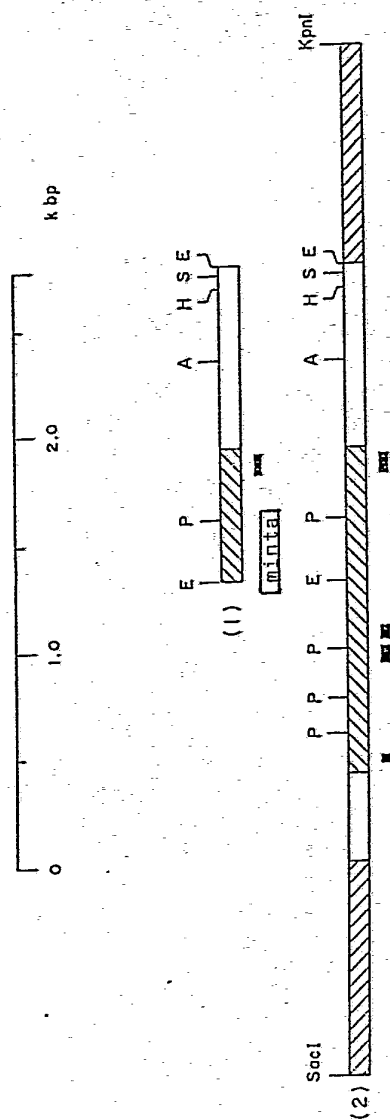
20 Z jelentése Ala vagy MetAla,

X jelentése Ala.

(Elsőbbsége: 1987. 06. 01.)

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakciót redukálószer jelenlétében végezzük.
25 (Elsőbbsége: 1987. 05. 31.)

1. abra



2 -(1). abra

GCGGGGAGTGCGGGAACAAAAATATCG

GTCAAAGCCGGATTATAGATCCCTTTGGCGTCACCATTGCGGCAGCGTCAGAAATGCCTG

CACTCATTATGGCGGAAGTGACGCCCCAACGTGTGCGTCAGGTGCGCGCAACTGCCCG

TCTTAAACAACCGTCCGCTTTGCGCCGCCGCATTTTTTACTCGGCGCTTGATTATTATG

ATGATTCACCTTGTTACAGATTGCTATTGTGTGCGCGCGTCAATGACCGTTAATATTCT

CTGGTTTTTAAGGCGCGTTCTGTTGCCGGTTATATGTCAAGAAGGTATCTATGGGTGAGA

TTAGTATTACCAAAGTCTGGTAGTTGCGGCGCCAACTGAAGCGCCGCGTCTGTGCCGAC

ATGCTGCGCCGCGCTCTGCTCTGCCTGGCCCTGACCGTCCTATTCCGCGCGGGTGCCGGC
MetLeuArgArgAlaLeuLeuCysLeuAlaLeuThrValLeuPheArgAlaGlyAlaGly
-20 -10

GCCCCGACGAGGAGGACCACGTCCTGGTGTCCATAAGGGCAACTTCGACGAGGCGCTG
AlaProAspGluGluAspHisValLeuValLeuHisLysGlyAsnPheAspGluAlaLeu
1 10 20

GCGGCCACAGTACCTGCTGGTGGAGTTCTACGCCCATGGTGCGGCCACTGCAAGGCT
AlaAlaHisLysTyrLeuLeuValGluPheTyrAlaProTrpCysGlyHisCysLysAla
30 40

CTGGCCCCGAGTATGCCAAAGCAGCTGGGAAGCTGAAGSCAGAAGGTTCTGAGATCAGA
LeuAlaProGluTyrAlaLysAlaAlaGlyLysLeuLysAlaGluGlySerGluIleArg
50 60

CTGGCCAAGGTGGATGCCACTGAAGAGTCTGACCTGGCCCAGCAGTATGGTGTCGAGGC
LeuAlaLysValAspAlaThrGluGluSerAspLeuAlaGlnGlnTyrGlyValArgGly
70 80

TACCCACCATCAAGTTCTTCAAGAATGGAGACACAGCTTCCCCAAAGGTACACAGCT
TyrProThrIleLysPhePheLysAsnGlyAspThrAlaSerProLysGluTyrThrAla
90 100

GGCCGAGAAGCGGATGATATCGTGAACCTGGCTGAAGAAGCGCACGGGCCCCGCTGCCAGC
GlyArgGluAlaAspAspIleValAsnTrpLeuLysLysArgThrGlyProAlaAlaSer
110 120

/folytatódik/

2 -(2).dbra

ACGCTGTCCGACGGGGCTGCTGCAGAGGCCCTTGGTGGAGTCCAGTGAGGTGGCCGTCATT
ThrLeuSerAspGlyAlaAlaAlaGluAlaLeuValGluSerSerGluValAlaValIle
130 140

GGCTTCTTCAAGGACATGGAGTCGGACTCCGCAAAGCAGTTCTTCTGGCAGCAGAGGTC
GlyPhePheLysAspMetGluSerAspSerAlaLysGlnPheLeuLeuAlaAlaGluVal
150 160

ATTGATGACATCCCCTTCGGGATCACATCTAACAGCGATGTGTTCTCCAAATACCAGCTG
IleAspAspIleProPheGlyIleThrSerAsnSerAspValPheSerLysTyrGlnLeu
170 180

GACAAGGATGGGGTTGTCTCTTTAAGAAGTTTGACGAAGGCCGGAACAACTTTGAGGGG
AspLysAspGlyValValLeuPheLysLysPheAspGluGlyArgAsnAsnPheGluGly
190 200

GAGGTCCACAAAGAAAAGCTTCTGGACTTCATCAAGCACACCAGTTGCCCTGGTCATT
GluValThrLysGluLysLeuLeuAspPheIleLysHisAsnGlnLeuProLeuValIle
210 220

GAGTTCACCGAGCAGACAGCCCCGAAGATCTTCGGAGGGGAAATCAAGACTCACATCCTG
GluPheThrGluGlnThrAlaProLysIlePheGlyGlyGluIleLysThrHisIleLeu
230 240

CTGTTCTGCCGAAAAGCGTGTCTGACTATGAGGGCAAGCTGAGCAACTTCAAAAAAGCG
LeuPheLeuProLysSerValSerAspTyrGluGlyLysLeuSerAsnPheLysLysAla
250 260

GCTGAGAGCTTCAAGGGCAAGATCCTGTTTATCTTCATCGACAGCGACCACTGACAAC
AlaGluSerPheLysGlyLysIleLeuPheIlePheIleAspSerAspHisThrAspAsn
270 280

CAGCGCATCCTGGAATTCTTCGGCCTAAAGAAAGAGGAGTGCCCGGCCGTGCGCCTCATC
GlnArgIleLeuGluPhePheGlyLeuLysLysGluGluCysProAlaValArgLeuIle
290 300

ACGCTGGAGGAGGAGATGACCAAATATAAGCCAGAGTCAGATGAGCTGACGGCAGAGAAG
ThrLeuGluGluGluMetThrLysTyrLysProGluSerAspGluLeuThrAlaGluLys
310 320

ATCACCGAGTTCTGCCACCGCTTCCTGGAGGGCAAGATTAAGCCCCACCTGATGAGCCAG
IleThrGluPheCysHisArgPheLeuGluGlyLysIleLysProHisLeuMetSerGln
330 340

GAGCTGCCTGACGACTGGGACAAGCAGCCTGTCAAAGTGCTGGTTGGGAAGAACTTTGAA
GluLeuProAspAspTrpAspLysGlnProValLysValLeuValGlyLysAsnPheGlu
350 360

GAGGTTGCTTTTGATGAGAAAAAGACGTCTTTGTAGAGTTCTATGCCCGTGGTGCGGT
GluValAlaPheAspGluLysLysAsnValPheValGluPheTyrAlaProTrpCysGly
370 380

CACTGCAAGCAGCTGGCCCCATCTGGGATAAGCTGGGAGAGACGTACAAGGACCACGAG
HisCysLysGlnLeuAlaProIleTrpAspLysLeuGlyGluThrTyrLysAspHisGlu
390 400

/folytatódik/

2 -(3).abra

AACATAGTCATCGCCAAGATGGACTCCACGGCCAACGAGGTGGAGGCGGTGAAAGTGCAC
AsnIleValIleAlaLysMetAspSerThrAlaAsnGluValGluAlaValLysValHis
410 420

AGCTTCCCACGCTCAAGTTCTTCCCCGCCAGCGCCGACAGGACGGTCATCGACTACAAT
SerPheProThrLeuLysPhePheProAlaSerAlaAspArgThrValIleAspTyrAsn
430 440

GGGGAGCGGACACTGGATGGTTTTAAGAAGTTCCTGGAGAGTGGTGGCCAGGATGGGGCC
GlyGluArgThrLeuAspGlyPheLysLysPheLeuGluSerGlyGlyGlnAspGlyAla
450 460

GGAGATGATGACGATCTAGAAGATCTTGAAGAAGCAGAAGCCTGATCTGGAGGAAGAT
GlyAspAspAspAspLeuGluAspLeuGluGluAlaGluGluProAspLeuGluGluAsp
470 480

GATGATCAAAAAGCTGTGAAAGATGAACCTGTAACACAGAGAGCCAGACCTGGGCACCAAA
AspAspGlnLysAlaValLysAspGluLeu
490

CCCGGACCTCCCAGTGGGCTGCACACCCAGCAGCACAGCCTCCAGACGCCCCGAGACCCCT

CCCAGCGAGGGAGCGTCGATTGGAAATGCAGGGAACTTTTCTGAAGCCACACTTCACTCT

ACCACACGTGCAAATCTAAACCCGCTTCTCTTTGCTTTTCAACTTTTGGAAAAGGGTTTA

TTTCCAGGCCAGCCCAGCCAGCCCATCTTGGTGGGCCTTTTTTTTTAAATCGTGATGTA

CTTTTTTTGTACCTGGTTTTGTCCAGAGTGCTCGCTAAATGTTTTGGACTCTCACGCTG

GCAATGTCTCTCATTCTGTTAGGTTTATACTATCACTTTAAAAAATTCCGTCTGTGGG

ATTTTTAGACATTTTTGGACGTCAGGGTGTGTGCTCCACCTTGGCCAGGCCTCCCTGGGA

CTCCTGCCCTCTGTGGGGCAGAACCAGGCAAGGCTGGACGGGTCCCTCACCTCATGCGGT

ATTGCCATGGTGGAGCGTGGCTCCTGCATCATTTGATTAAATGGAGACTTTCCGGTCTCT

GTCACAGGCCGCTCCCCAACCGTGAGTGGAGGGTGTGGCTGGGCCAGGACAAGCCCAGCA

fa1vtat6dik

2 -(4).abra

CTGTGCCAGGCAGAACC GGGACCCTTCGTTTCCAGGCTGGGAGACAGCCAAGGATGCTTG

GCCCCCTCCTTCCCCAAGCCAGGGTCCTTATTGCTCTGTGATGTCCAGGGTGGCCTGAGG

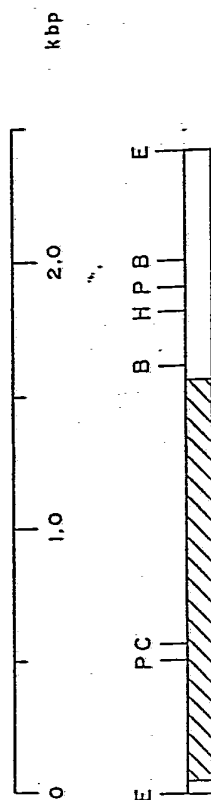
AGCTGAATCACATGTTGACAGTTCCTTCAGGCATTTCTACCACAATATTGGAATTGGACAC

ATTGGCCAAATAAAGTTAAATTTCTGCCAAAAAAAAAAAA

3. abra

¹
Z ProGluGluGluAspHisValLeuValLeuArgLysSerAsnPheAlaGluAla
LeuAlaAlaHisLysTyrLeuLeuValGluPheTyrAlaProTrpCysGlyHisCysLys
AlaLeuAlaProGluTyrAlaLysAlaAlaGlyLysLeuLysAlaGluGlySerGluIle
ArgLeuAlaLysValAspAlaThrGluGluSerAspLeuAlaGlnGlnTyrGlyValArg
GlyTyrProThrIleLysPhePheArgAsnGlyAspThrAlaSerProLysGluTyrThr
AlaGlyArgGluAlaAspAspIleValAsnTrpLeuLysLysArgThrGlyProAlaAla
ThrThrLeu X AspGlyAlaAlaAlaGluSerLeuValGluSerSerGluValAlaVal
IleGlyPhePheLysAspValGluSerAspSerAlaLysGlnPheLeuGlnAlaAlaGlu
AlaIleAspAspIleProPheGlyIleThrSerAsnSerAspValPheSerLysTyrGln
LeuAspLysAspGlyValValLeuPheLysLysPheAspGluGlyArgAsnAsnPheGlu
GlyGluValThrLysGluAsnLeuLeuAspPheIleLysHisAsnGlnLeuProLeuVal
IleGluPheThrGluGlnThrAlaProLysIlePheGlyGlyGluIleLysThrHisIle
LeuLeuPheLeuProLysSerValSerAspTyrAspGlyLysLeuSerAsnPheLysThr
AlaAlaGluSerPheLysGlyLysIleLeuPheIlePheIleAspSerAspHisThrAsp
AsnGlnArgIleLeuGluPhePheGlyLeuLysLysGluGluCysProAlaValArgLeu
IleThrLeuGluGluGluMetThrLysTyrLysProGluSerGluGluLeuThrAlaGlu
ArgIleThrGluPheCysHisArgPheLeuGluGlyLysIleLysProHisLeuMetSer
GlnGluLeuProGluAspTrpAspLysGlnProValLysValLeuValGlyLysAsnPhe
GluAspValAlaPheAspGluLysLysAsnValPheValGluPheTyrAlaProTrpCys
GlyHisCysLysGlnLeuAlaProIleTrpAspLysLeuGlyGluThrTyrLysAspHis
GluAsnIleValIleAlaLysMetAspSerThrAlaAsnGluValGluAlaValLysVal
HisSerPheProThrLeuLysPhePheProAlaSerAlaAspArgThrValIleAspTyr
AsnGlyGluArgThrLeuAspGlyPheLysLysPheLeuGluSerGlyGlyGlnAspGly
AlaGlyAspAspAspLeuGluAspLeuGluGluAlaGluGluProAspMetGluGlu
AspAspAspGlnLysAlaValLysAspGluLeu

4. abra



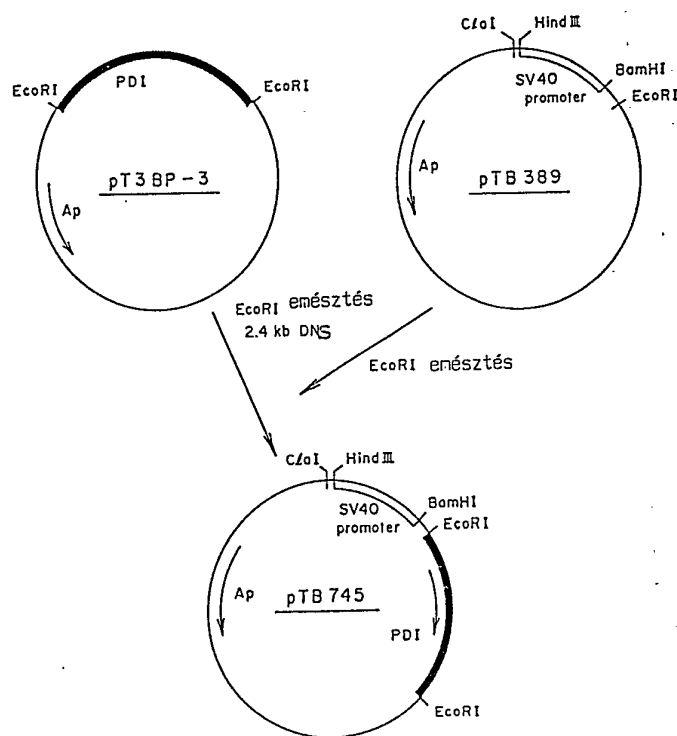
5 -(1).abra

10 20 30 40 50 60
GAATTCGGGGCGGCGCCAACCGAAGCGCCCGCCTGATCCGTGTCGACATGCTGCGC
MetLeuArg
-13
ArgAlaLeuLeuCysLeuAlaValAlaAlaLeuValArgAlaAspAlaProGluGluGlu
-1 1
CGCGCTCTGCTGTGCTGGCGGTGGCCGCCCTGGTGGCGCGCGACGCCCCGAGGAGGAG
AspHisValLeuValLeuArgLysSerAsnPheAlaGluAlaLeuAlaAlaHisLysTyr
GACCACGTCTGCTGTGCTGCGGAAAAGCAACTTCGCGGAGGCGCTGCGGCCCAAGTAC
LeuLeuValGluPheTyrAlaProTrpCysGlyHisCysLysAlaLeuAlaProGluTyr
CTGCTGGTGGAGTTCTATGCCCTTGGTGTGGCCACTGCAAGGCTCTGGCCCTGAGTAT
AlaLysAlaAlaGlyLysLeuLysAlaGluGlySerGluIleArgLeuAlaLysValAsp
GCCAAGCCGCTGGGAAGCTGAAGGCAGAAGGTTCCGAGATCAGGTTGCCAAGGTGGAC
AlaThrGluGluSerAspLeuAlaGlnGlnTyrGlyValArgGlyTyrProThrIleLys
GCCACGGAGGAGTCTGACTGGCCAGCAGTACGGCGTGGCGGGCTATCCACCATCAAG
PhePheArgAsnGlyAspThrAlaSerProLysGluTyrThrAlaGlyArgGluAlaAsp
TTCTTCAGGAATGGAGACACGGCTTCCCCAAGGAATATACAGCTGGCAGAGAGGCTGAT
AspIleValAsnTrpLeuLysLysArgThrGlyProAlaAlaThrThrLeuProAspGly
GACATCGTGAATGGCTGAAGAAGCGCACGGGCCGGCTGCCACCACCTCTGCTGACGGC
AlaAlaAlaGluSerLeuValGluSerSerGluValAlaValIleGlyPhePheLysAsp
GCAGCTGCAGAGTCCTTGGTGGAGTCCAGCGAGGTGGCTGTCATCGGCTTCTTCAAGGAC
ValGluSerAspSerAlaLysGlnPheLeuGlnAlaAlaGluAlaIleAspAspIlePro
GTGGAGTCGGACTCTGCCAAGCAGTTTTCAGGCAGCAGAGGCCATCGATGACATACCA
PheGlyIleThrSerAsnSerAspValPheSerLysTyrGlnLeuAspLysAspGlyVal
TTTGGGATCACTTCCAACAGTGACGTGTTCTCCAAATACCAGCTCGACAAAGATGGGGTT
ValLeuPheLysLysPheAspGluGlyArgAsnAsnPheGluGlyGluValThrLysGlu
GTCTCTTTAAGAAGTTTGATGAAGGCCGGAACAACCTTTGAAGGGGAGGTCACCAAGGAG
AsnLeuLeuAspPheIleLysHisAsnGlnLeuProLeuValIleGluPheThrGluGln
AACCTGCTGGACTTTATCAAACACAACAGCTGCCCTTGTCTATCGAGTTCACCGAGCAG
ThrAlaProLysIlePheGlyGlyGluIleLysThrHisIleLeuLeuPheLeuProLys
ACAGCCCCGAAGATTTTGGAGGTGAAATCAAGACTCACATCCTGCTGTTCTTGCCCAAG
SerValSerAspTyrAspGlyLysLeuSerAsnPheLysThrAlaAlaGluSerPheLys
AGTGTGTCTGACTATGACGGCAAACTGAGCAACTTCAAAACAGCAGCCGAGAGCTTCAAG
GlyLysIleLeuPheIlePheIleAspSerAspHisThrAspAsnGlnArgIleLeuGlu
GGCAAGATCCTGTTTCATCTTCATCGACAGCGACACACCGACAACCAGCGCATCCTCGAG
PhePheGlyLeuLysLysGluGluCysProAlaValArgLeuIleThrLeuGluGluGlu
TTCTTTGGCCTGAAGAAGGAAGAGTCCCCGCCGTGCGCCTCATCACCTGGAGGAGGAG
MetThrLysTyrLysProGluSerGluGluLeuThrAlaGluArgIleThrGluPheCys
ATGACCAAGTACAAGCCCCGAATCGGAGGAGCTGACGGCAGAGAGGATCACAGAGTTCTGC

5 -(2).dbva

HisArgPheLeuGluGlyLysIleLysProHisLeuMetSerGlnGluLeuProGluAsp
CACCGCTTCCTGGAGGGCAAAATCAAGCCCCACCTGATGAGCCAGGAGCTGCCGGAGGAC
TrpAspLysGlnProValLysValLeuValGlyLysAsnPheGluAspValAlaPheAsp
TGGGACAAGCAGCCTGTCAAGGTGCTTGTGGGAAGAACTTTGAAGACGTGGCTTTTGAT
GluLysLysAsnValPheValGluPheTyrAlaProTrpCysGlyHisCysLysGlnLeu
GAGAAAAAAACGCTCTTTGTGGAGTTCTATGCCCATGGTGTGGTCACTGCAACAGTTG
AlaProIleTrpAspLysLeuGlyGluThrTyrLysAspHisGluAsnIleValIleAla
GCTCCCATTTGGGATAAACTGGGAGAGACGTACAAGGACCATGAGAACATCGTCATCGCC
LysMetAspSerThrAlaAsnGluValGluAlaValLysValHisSerPheProThrLeu
AAGATGGACTCGACTGCCAACGAGGTGGAGGCCGTCAAAGTGCACAGCTTCCCCACATG
LysPhePheProAlaSerAlaAspArgThrValIleAspTyrAsnGlyGluArgThrLeu
AAGTTCTTCTGCCAGTGCCGACAGGACGGTCATTGATTACAACGGGGAACGCACGCTG
AspGlyPheLysLysPheLeuGluSerGlyGlyGlnAspGlyAlaGlyAspAspAspAsp
GATGGTTTTAAGAAATTCCTGGAGAGCGGTGGCCAGGATGGGGCAGGGGATGATGACGAT
LeuGluAspLeuGluGluAlaGluGluProAspMetGluGluAspAspAspGlnLysAla
CTCGAGGACCTGGAAGAAGCAGAGGAGCCAGACATGGAGGAAGACGATGATCAGAAAGCT
490
ValLysAspGluLeuTrn
GTGAAAGATGAACTGTAATACGCAAAGCCAGACCCGGGCGCTGCCGAGACCCCTCGGGGG
CTGCACACCCAGCAGCAGCGCACGCCCTCCGAAGCCTGCGGCCCTCGCTTGAAGGAGGGCGT
CGCCGGAAACCCAGGGAACCTCTCTGAAGTGACACCTCACCCCTACACACCGTCCGTTCA
CCCCCGTCTCTTCTCTTCTGCTTTTTCGGTTTTTGGAAAGGGATCCATCTCCAGGCAGCCCA
CCCTGGTGGGGCTTGTTCCTGAAACCATGATGTACTTTTTCATACATGAGTCTGTCCAG
AGTGCTTGCTACCGTGTTCCGGAGTCTCGCTGCCCTCCCTCCCGGGAGGTTTCTCTCTT
TTTGAAATTCCTCTGTGGGATTTTTAGACATTTTTCGACATCAGGGTATTTGTTCAC
CTTGGCCAGGCCCTCCTCGGAGAAGCTTGTCCCCCGTGTGGGAGGGACGGAGCCGGACTGG
ACATGGTCACTCAGTACCGCCTGCAGTGTGCCCATGACTGATCATGGCTCTTGCAATTTT
GGGTAAATGGAGACTTCCGGATCCTGTCAAGGTGTCCCCATGCCTGGAAGAGGAGCTGG
TGGCTGCCAGCCCTGGGGCCCGGCACAGGCCCTGGGCCCTTCCCTTCCCTCAAGCCAGGGC
TCCTCCTCCTGTCTGTGGGCTCATTGTGACCACTGGCCTCTCTACAGCACGGCCTGTGGCC
TGTTCAGGCAGAACACGACCCCTTGACTCCCGGGTGGGGAGGTGGCCAAGGATGCTGGA
GCTGAATCAGACGCTGACAGTTCTTCAGGCATTTCTATTTTCAATCGAATTGAACACAT
TGGCCAAATAAAGTTGAAATTTTACCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

6. ábra



7. d'brac

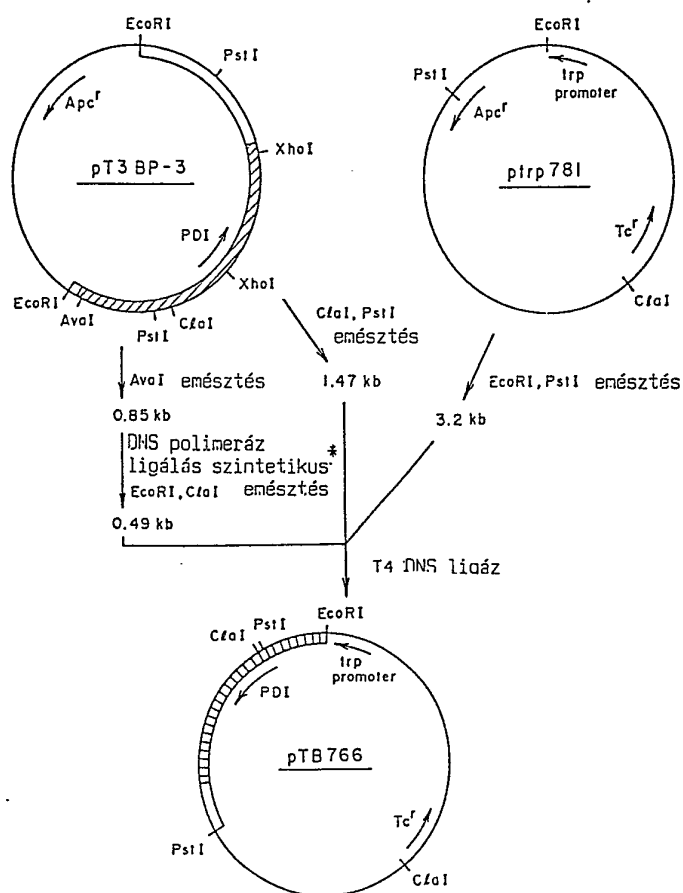
(1)



(2)



8. ábra

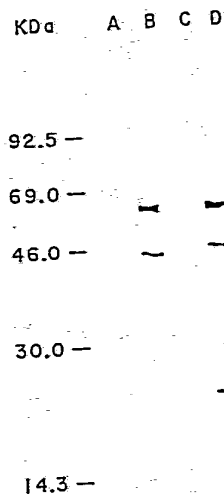


* szintetikus adapter

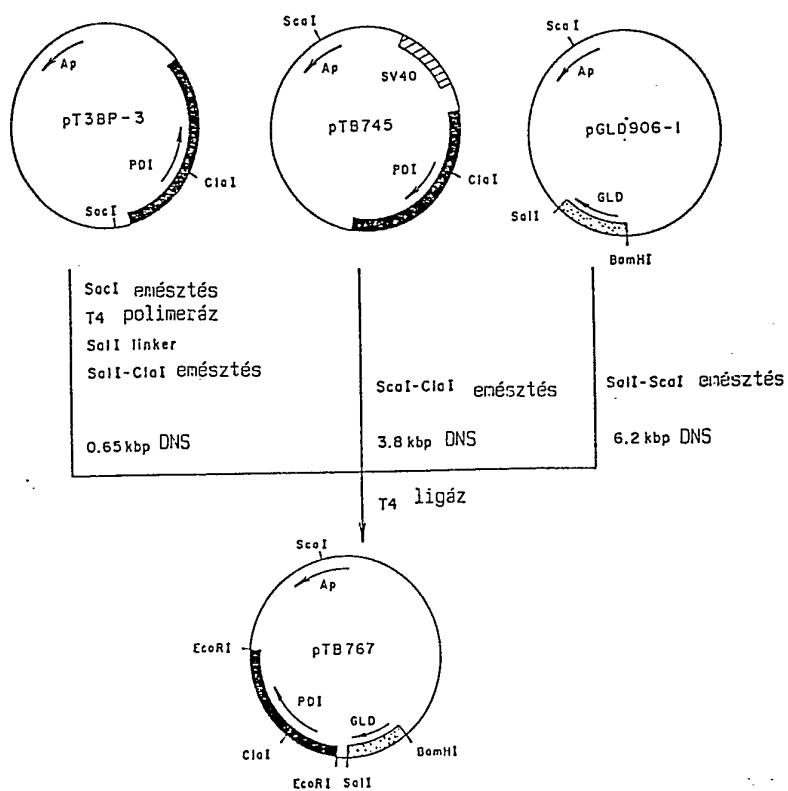


HU 204566 B
Int. Cl.⁵: C 12 N 15/61

9-dbra

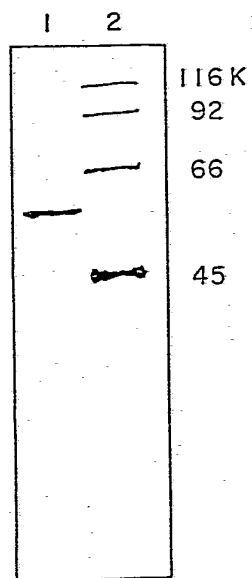


10. ábra



HU 204566 B
Int. Cl.⁵: C 12 N 15/61

11. abra



12. ábra

