

KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY

2004. 1. 91

Eljárás idegen DNS szomatikus és csira-állatsejtekbe való bevitelére

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE, Róma, OLASZORSZÁG

A ~~nemzeti~~ bejelentés napja: 1990. 01. 08.

A ~~nemzetközi~~ bejelentés száma: PCT/EP90/00032

58818

Elsőbbsége: 1989. 01. 10. (19050 A/89)

OLASZORSZÁG

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP90/00032
A nemzeti bejelentés száma: WO 90/08192

Kivonat

A találmány tárgya idegen DNS szomatikus vagy csira-
-állatsejtbe való beültetése; az eljárásban a módosítandó
állat ondósejtjébe idegen vagy ismert rekombináns-DNS-
-eljárásokkal módosított DNS-t vezetnek be, és az így kapott
ondósejtet a szokásos mesterséges megtermékenyítési el-
járásokkal petesejtek megtermékenyítésre alkalmazzák.

Földvár

1033/90

2804 1/91

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT.

Budapest

58818

NS205 C12N15/87

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A

Eljárás idegen DNS szomatikus és csira állatsejtekbe
való bevitelére

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE, Róma, OLASZORSZÁG

Feltalálók:

SPADAFORA Corrado, Róma, OLASZORSZÁG

A ~~nemzetközi~~ bejelentés napja: 1990. 01. 08.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP90/00032

Elsőbbsége: 1989. 01. 10. (19050 A/89)

OLASZORSZÁG

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/08192

72798-1770/SL

A találmány tárgya eljárás idegen DNS szomatikus és csira állatsejtekbe való bevitelére. A találmány elsősorban idegen vagy ismert eljárásokkal módosított rekombináns DNS-nek a módosítandó állati ondósejtbe való bevitelére, valamint az így módosított ondósejt alkalmazására vonatkozik, petesejtnak ismert megtermékenyítési eljárásokkal megvalósított megtermékenyítésére.

A saját genomjuktól idegen és egyéb genetikai rendszerekből származó genetikai információkat véglegesen integráló transzgén állatok a mai napig, mind kémiai, mind gyógyászati szempontból, valamint a házi emlős-, hal-, tüskésbőrű- és kétéltű-tenyésztés tekintetében, a genetikai tanulmányok előterében állnak. Létrehozhatók különösen előnyös tulajdonságokkal rendelkező állatok. Tenyészállatok kialakításakor például nagy növekedési sebességű, betegségekkel szemben ellenálló, új gyógyszerek kipróbálásához pedig bizonyos betegségekkel szembeni fogékony állatok alakíthatók ki. A transzgén állatok létrehozását célzó első kísérletek a hetvenes évek közepére nyulnak vissza. Ezek a kísérletek főleg egérembriók vagy tenyészetet sejtek manipulálásán és a DNS (például SV40) közvetlen egér csirasejt üregekbe való bevezetésén alapulnak, amint azt M.H.L. és A. McLaren: *Experimental Cell Research* 86, 1-8 (1974); és R. Jaenisch és B. Mintz: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1250-54 (1974)) irodalmi helyen ismertetik.

A kapott eredmények azonban, elsősorban az alkalmazott eljárás nehézségei miatt, nem voltak kielégítőek.

John W. Gordon és munkatársai: Proc. Acad. Sci. USA, 77(12), 7380-84 (1980) irodalmi helyen az egérembriók genetikai transzformálásához egy olyan eljárást ismertetnek, amelyben a megtermékenyített oociták pronukleuszába klónozott DNS-t mikroinjektálnak. Az így kezelt zigótákat egy áltérhes anya méhébe ültetik, és kihordatják a terhességet.

Ez az eljárás, amelyet később finomítottak, azt mutatja, hogy egér szomatikus és csirasejtekbe való idegen DNS beültetéssel transzgén állatok hozhatók létre.

Tipikus transzgén állatok a 4 736 866 számú USA-beli szabadalmi leírásban ismertetett, olyan idegen DNS-nek a megtermékenyített csirasejtbe való mikroinjektálásával létrehozott, daganatgyógyászati kísérletekben alkalmazott egerek, amelyek szomatikus és csirasejtjeikben onkogén szekvenciát tartalmaznak.

A mikroinjektálással megvalósított eljárást a tenyésztésben kísérletezték ki; azonban a létrehozott tulajdonságokról nincs információnk.

A DNS-nek a megtermékenyített oocitákba való mikroinjektálása mindenesetre nagyon bonyolult és költséges eljárás; az eljárás hatásfoka a nagyarányú abortusz, az állatokban kialakuló mozaikhatás és nagymértékű sterilitás miatt kicsi.

A találmány tárgya valamilyen, a rekombináns DNS technika ismert eljárásával kezelt DNS-nek olyan állatfajhoz tartozó állatsejtjeibe való bevezetésére alkalmas eljárás, amelyben nincsenek jelen a bevezetett tipikus idegen DNS

szekvenciák; a DNS bevezetés eredményeként a rekombináns DNS-ben lévő genetikus információk véglegesen a kezelt egyed genomjába integrálódnak, és ezért az egyed következő utódjába transzmittálódhatnak.

A klónozott DNS-nek különböző állatfajták sejtjeibe való, találmány szerinti eljárással megvalósított bevezetése azon a kísérleti megfigyelésen alapul, hogy az ondófejbe különböző molekulák, akár nagy méretű molekulák is könnyen behatolnak.

Ez az emlős és egyéb állatfajok ondósejtjeire egyaránt tipikus tulajdonság hasznosítható az ondósejt transzferálható klónozott DNS bevezetésével megvalósított módosítására.

A módosított ondósejteket azután a megfelelő oociták megtermékenyítésére alkalmazzuk. A megtermékenyítést a nem módosított ondósejthez alkalmazott mesterséges megtermékenyítési eljárással végezzük.

A találmány lényege, hogy azon állatok ondósejtjeit, amelyekbe a saját genomjától idegen, más rendszerekből származó genetikai információkat viszünk be, vektorként alkalmazzuk az idegen DNS transzformálásához.

A találmány szerinti eljárás egyik lehetséges változatában úgy járunk el, hogy

- a) készítünk egy vizes ondósejt szuszpenziót;
- b) az ondósejteket klónozott DNS-sel transzformáljuk;
- c) a módosított ondósejtekkel in vitro oocita megtermékenyítést végzünk; és

d) a megtermékenyített oocitákat a kiválasztott fajta állerhes nőtényeibe ültetjük.

A találmány szerinti eljárás egy másik változatában a módosított ondósejteket közvetlen az állat megtermékenyítésére alkalmazzuk anélkül, hogy in vitro oocita megtermékenyítést és ezt követően ezek állerhes nőtényekbe való beültetését végeznénk.

A találmánynak ez a változata különösen előnyös a nemesítési eljárásokban.

A találmány szerinti eljárás sokkal egyszerűbb, sokkal gyorsabb és kevésbé költséges, mint a mikroinjekciós eljárás, emellett nem jár együtt a mikroinjekciós eljárásnál olyan gyakori abortusszal.

A találmány szerinti eljárás részletesebb bemutatására a következőkben egér ondósejt módosítását ismertetjük.

A kísérleteinkhez azért alkalmazzuk ezt az állatot, mert a szakirodalomban bőségesen rendelkezésre állnak a laboratóriumi in vitro megtermékenyítésére, valamint génjeinek integrálására és kifejezésére vonatkozó tanulmányok.

Idegen DNS-ként a pSV2 CAT, poliómia és humán növekedési gént alkalmazzuk, mert ezek restrikciós térképe az irodalomból ismert, és az egér genomban természetesen nem előforduló bázisszekvenciákat tartalmaznak.

A kezelt ondósejttel megtermékenyített petesejtekből származó, ugynevezett "pozitív" egerekben ezek a szekvenciák azonosíthatók, ami kétséget kizáróan azt bizonyítja, hogy a klónozott DNS valóban a kezelt ondósejtekbe, és ezeken ke-

resztül a megtermékenyített petesejtekbe került, és ezáltal a kapott transzgén egyedek genomjába integrálódott.

A kísérletet a következőképpen végezzük:

a) Ondósejt előállítás

Egy him egér mellékheréiből 1 ml PM pufferbe (amelyet D.G. Whittingam: Culture of Mouse, (1971), J. Reprod. Fert. Supp. 14, 7-21 irodalmi helyen ismertetett eljárásával állítunk elő) ondósejtet nyomunk, és az így kapott szuszpenziót az ondósejt elválasztására kicentrifugáljuk, és az ondósejteket ismét 1 ml pufferben szuszpendáljuk.

A fenti kezelést ötször megismételjük, az ondósejteknek a spermafolyadéktól való teljes "kimosására". A puffert úgy módosítjuk, hogy kihagyjuk a nátrium-laktátot, penicillint és streptomocint, a mononátrium-foszfátot 0,15 mmól/l dinátrium-foszfáttal helyettesítjük, és a nátrium-klorid mennyiségét 120 mmól/l értékre változtatjuk.

Az ondósejt szuszpenziót ezután 1-2 milliő/ml koncentrációra hígítjuk, és 20-37 °C hőmérsékleten, legalább 5-10 térfogat% szén-dioxid-tartalmu levegőben, 30 perctől 3 óráig terjedő ideig inkubáljuk.

b) Az ondósejtek DNS transzformálása

A hígított ondósejt szuszpenzióhoz 500 µl-es frakciókban hozzáadjuk az ondósejtbe beültetendő, klónozott, kör alakú DNS oldatát, és az így kapott elegyet 0-37 °C hőmérsékleten, 5-10 térfogat% szén-dioxid-tartalmu levegőben, legalább 30 percig tovább inkubáljuk. A DNS ondósejtbe való beültetése az ondósejt nukleáz csökkent endogén aktivitása miatt, az

alacsonyabb hőmérsékleteken könnyebb, de ilyenkor az inkubációs idő 30 percnél hosszabb. A klónozott, kör alakú DNS oldatát olyan mennyiségben alkalmazzuk, hogy a klónozott DNS elegy végső koncentrációja 0,4-2 $\mu\text{g/ml}$ legyen.

c) Petesejt megtermékenyítése

Érett nőstény egereket humán koronikus gonadotropinnal szuperovulációra serkentjük, és a petesejteket a petevezetékbe az injekció után 14,5 óra múlva extraháljuk (B. Hogan és munkatársai: Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, CSM New York (1986)).

A petevezetékbe extrahált petesejteket a transzformált ondósejt 500 μl -es frakcióihoz adjuk, és 20-37 °C hőmérsékleten, legalább 5-10 térfogat% szén-dioxid-tartalmú levegőben, 5-10 órán át inkubáljuk. Ekkor a petesejteket M16 pufferral kimossuk (a puffert a fenti a) pontban ismertetett Whittingham eljárással állítjuk elő), és 50 μl ilyen pufferben tartjuk egy éjszakán át.

Az embriókat 24 óra múlva sebészeti úton, kétsejt-fázisban ártérhes nőstények petevezetésébe ültetjük át. A beültetésből származó utódokból 3 hetes korukban farokvég-fragmentet amputálunk, és az ebből extrahált DNS-t a "Southern-folt" eljárással elemezzük (T. Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSM, New York, (1984)).

Az elemzéssel azonosítjuk a "pozitív" egyedeket, azaz azokat az egyedeket, amelyek genomja integrált vagy episzomikus formában a kiindulási ondósejtbe bevezetett kló-

nozott DNS egy vagy több másolatát tartalmazza.

A találmány szerinti eljárással előállított "pozitív" egyedek hozama minden esetben nagyobb, mint 30-70 %, és nincs köztük steril egyed.

A pozitív állatok ezt követő genetikai jellemzését a restrikciós és szekvenciaelemzési eljárásával végezzük.

A pozitív egerek genom DNS-ének elemzését a következő két eljárással végezzük:

Restrikciós elemzés

A DNS restrikciós elemzést specifikus restrikciós enzimekkel végezzük, amelyek a genom DNS-t fragmentekre bontják. Az így kapott fragmenteket enzután elektroforézissel frakcionáljuk, és az ismert Southern-folt eljárással nitro-cellulóz szűrőre vesszük. A szűrőt ezután egy, az ondősejtek transzformálására alkalmazott, kezdeti klónozott DNS-re specifikus, P^{32} -vel radioaktívá tett, próbával kezeljük, és röntgensugár érzékeny filmen exponáljuk.

A film azokon a helyeken exponálódik, ahol a radioaktív próba szűrőhöz kötődik, és a radioaktív DNS kötés mindegyike egy DNS fragment szignálnak felel meg.

Az egy vagy több szignál jelenléte, ezek száma és az általuk képviselt DNS fragmentek mérete lehetővé teszi a pozitív egér genommal analóg szekvenciák létezésének igazolását, és a restrikciós térkép felvételét.

A fenti térkép, valamint az ondősejtekbe beültetett és "pozitív" egereket eredményező klónozott DNS térképének analógiája azt bizonyítja, hogy az eredeti klón szekvenciák

a transzgén egér genomjába integrálódnak.

Szekvenciaelemzés

A "pozitív" egér genomot alkotó szekvenciák elemzéséhez 15 μ g pozitív egér genom DNS-t és 15 μ g ampicillinre rezisztens pUC13 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel hasítunk.

A két hasított DNS-t ezután összekeverjük, recirkuláltatjuk, és Escherichia coli HB101 baktériumba vezetjük, és az így kezelt baktériumot agar + ampicillin közegen tenyésztjük.

A pozitív kolóniákat, azaz a klónozott fragmenteket tartalmazó kolóniákat elválasztjuk, sokszorozítjuk, és tisztítjuk. A klónozott fragmentet ezután EcoRI-vel hasítva a pUC13 vektortól elválasztjuk, és belőle azután a Langer-eljárással a 626 bázisokat szekvenáljuk.

Ezzel az eljárással meggyőződhetünk arról, hogy a kezdeti klón az ondósejtekből a megtermékenyített petesejtekbe transzferálódott, majd a létrehozott egyed genomjába integrálódott.

A fentiekben ismertetett két eljárás mellett az idegen DNS elhelyezkedésének igazolására alkalmas elemzést is lefolytatunk a klónozott DNS-sel transzformált ondósejt vizsgálatával.

Erre a célra H^3 -mal jelzett DNS-sel különböző mennyiségű ondósejt oldatokat inkubálunk. Az inkubálás után optikai és elektronmikroszkópos felvételeket készítünk. A kapott eredmények egyértelműen azt bizonyítják, hogy a klónozott DNS specifikusan az ondófej belsőjében, az

egyenlítő alatti helyzetben helyezkedik el. A radioaktivitás nyomai az ondófej egyéb régióiban elhanyagolhatók.

Ismeretes, hogy az ondósejtek és oociták egyesülési reakciója a megtermékenyítés pillanatában (az ondóstejtekből a petesejtekbe transzferálódó genetikai anyaggal) a vizsgált régióban megy végbe, és feltételezzük, hogy az idegen DNS az adott állatra jellemző DNS-sel azonos időben és módon transzferálódik. Az a mechanizmus magyarázatul szolgálhat a találmány szerinti eljárás előre nem látható hatékonyságára is.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás idegen DNS-nek szomatikus és csira állatsejtekbe való bevezetésére, **azzal jellemezve**, hogy az idegen vagy ismert rekombináns DNS eljárásokkal módosított DNS-t bevezetjük a módosítandó állat ondósejtjeibe, és az így kapott ondósejteket valamilyen szokásos mesterséges megtermékenyítési eljárással petesejtek megtermékenyítésére alkalmazzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy

- a) készítünk egy vizes ondósejt szuszpenziót;
- b) az ondósejteket klónozott DNS-sel transzformáljuk;
- c) a módosított ondósejtekkel in vitro oocita megtermékenyítést végzünk; és
- d) a megtermékenyített oocitákat a kiválasztott fajta állerhes nőtényeibe ültetjük.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a vizes ondósejt szuszpenziót FM pufferben puffereljük, 1-2 millió/ml ondósejt-koncentrációra hígítjuk, és 20-37 °C hőmérsékleten, legalább 5-10 térfogat% szén-dioxid-tartalmu levegőben, 30 perctől 3 óráig terjedő ideig inkubáljuk.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az ondósejtbe beültetendő, köralaku klónozott DNS-t tartalmazó oldatot az inkubált vizes ondósejt szuszpenzióhoz adjuk, majd 0-37 °C hőmérsékleten, legalább 30 percig inkubáljuk, ahol az oldatot olyan mennyiségben alkalmazzuk, hogy

az elegy klónozott DNS-re vonatkozó végső koncentrációja 0,4-2 µg/ml legyen.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a megtermékenyítendő oocitákat az inkubált vizes ondósejt szuszpenzióhoz adjuk, és az elegyet 20-37 °C hőmérsékleten, legalább 5-10 térfogat% szén-dioxid-tartalmu levegőben 5-10 órán át inkubáljuk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a megtermékenyített oocitákból származó embriókat kétsejtes fejlődési állapotukban sebészeti uton áalterhes nőstények petevezetékébe ültetjük át.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
10. 

12 oldal

Földvár