

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

K I V O N A

50870

p205

C 12 N 15/13

AG 1 K 38/395

Eljárás humán adenokarcinoma

antigén elleni új rekombináns és kimer antitest előállításával

ELI LILLY and COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1989. 04. 20.

Unió elsőbbsége: 1988. 04. 21. (07/184,522)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány eljárás KSA megkötésére képes antitest
láncok expressziójára transzformált vagy transzfektált sej-
tekkel.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy

- a) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező könnyű
láncot kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort
állítunk elő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr
Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu
Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
Arg Asn Glu Cys

- b) az emésztett vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk, és
- c) az említett gazdasejtet az említett könnyű láncu gén expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

Főfelvétel

49.378/SZE

1925/89

21074/89

BUDAPESTI NEMZETKÖZI
ÜGYVÉDI MUNKAKÖZÖSSÉG
SZABADALMI IRODA
DALSZINHÁZ U 10 1533-73

NS205

C 12 N15 / 13

A61K39/395

A
**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

E-50870

Eljárás humán adenokarcinoma
antigén elleni új rekombináns és kimerő antitestek
előállítására

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: BEAVERS Lisa Selsam, TRAFALGAR,

BUMOL Thomas Frank, CARMEL,

GADSKI Robert Alan, INDIANAPOLIS,

WEIGEL Barbara Jean, INDIANAPOLIS,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1989. 04. 20.

Unió elsőbbsége: 1988. 04. 21. (07/184,522)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgya eljárás új DNS vegyületek és
rekombináns DNS klónozó vektorok előállítására, azzal
jellemmezve, hogy a KS1/4 monoklonális antitestet kódolják,

valamint a KS1/4-ből származó egér/humán kiméra antitesteket. A vektorok lehetővé teszik az új DNS vegyületek expresszióját nem-limfoid eukarióta sejtekben. A jelen találmány szerint előállíthatók az új klónozóvektorokkal transzformált gazdasejtek. A transzformált gazdasejtek kifejezik a rekombináns vagy kiméra KS1/4 antitesteket vagy ezek származékait. Az ismertetett DNS-vegyületek közül számos használható arra, hogy korábban sem a természetben, sem a laboratóriumban elő nem állított KS1/4 származékokat állítsunk elő vele, és a jelen találmányhoz tartoznak ezek a különleges molekulák.

A KS1/4 egy monoklonális antitest egy rágcső antitest amely specifikusan a 40.000 dalton méretű, sejtfelületi antigénhez^{kötődik}, amely nagy sűrűségben található adenokarcinóma sejteken, valamint megtalálható normál epiteliális sejteken. Erről az antitestről igazolták, hogy hatékonyan használható a betegség in vitro detektálására, valamint az adeno karcinóma in vivo diagnosztizálására és kezelésére. Újabb vizsgálatok megerősítették, hogy a KS1/4 gyógyszer konjugátumok dózis-függő daganatnövekedés-gátló hatást mutatnak. Lásd Spearman et al., J. Pharmacol and Exp. Therapeutics, 241, 695-703 (1987); Bumol et al., Ceriani, R.L., szerkesztette Immunological

Approches to the diagnosis and Therapy of Breast Cancer. New York and London: Plenum Press; 205-215 (1987); és Bumol a Reisfeld R.A. és Sell, S. szerkesztette Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, New York: Alan R. Liss, Inc; 257-259 (1985).

Rágcsáló antitestek emberben való alkalmazásából akkor adódik probléma, amikor a rákos beteg immunrendszere antitesteket képez a rágcsáló immunoglobulinokkal szemben. Ez az immunválasz nem jön létre minden kezelt betegben, de ha igen, akkor ennek eredményeként a kezelés hatékonysága fokozatosan csökken a többszörös dózisok tartományában. A beteg immunválasza okozhatja a rágcsáló antitest gyors kiürülését a véráramból. Ez a válasz vezethet rosszabb reakciókhoz is, mint például anafilaxishoz és sérumbetegséghez. Az immunogenitás kizárja az antitest többszörös dózisban való adagolását és így csökkenti a kezelés klinikai értékét.

Humán monoklonális antitesteket nehéz előállítani, ezért az immunológiai problémák elkerülésére kiméra antitesteket készítenek. A kiméra antitestek az egyik fajból származó antigén specifikus vagy változó régióját tartalmazzák egy másik fajból származó konstans régióhoz kapcsolva. [Lásd O; and Morrison Biotechniques, 4 214-221 (1986)]. Mivel az immunológiai reakció gyakran

a konstans régióval szemben alakul ki, ezért a rágcsgáló konstans régiót~~ot~~ humán konstans régióval helyettesítve nagymértékben csökken a páciens immunológiai reakciója. Ennélfogva a kiméra antitestekre nagy szükség van a betegség kezelésében.

A kiméra antitestekre vonatkozó általános elképzelést leírták, mégis adott specifitással rendelkező új kiméra antitestek kiméra antitestek kifejlesztése még nem megoldott.

A jelen találmány olyan rekombináns DNS és aminosav szekvenciákkal foglalkozik, amelyek a teljes KS1/4 monoklonális antitest molekulát magukba foglalják. Ezeket a szekvenciákat úgy változtattuk meg, hogy a KS1/4-gyel azonos szövetspecifitással rendelkező kiméra antitesteket expresszálganak, de amelyek humán eredetű konstans régiókat tartalmaznak. A találmány szerinti eljárás olyan terápiás hatású anyag előállítását teszi lehetővé, amely a KS1/4-gyel azonos szövetspecifitással rendelkezik, de az immunológiai mellékhatásai nagymértékben lecsökkentek.

A jelen találmány tárgya továbbá a KS1/4 rekombináns DNS és aminosav szekvenciái. Ezeknek a szekvenciáknak az ismerete lehetővé teszi képzett szakemberek számára, hogy új, a KS1/4 antigénnel szemben módosított affinitással rendelkező KS1/4 származékokat állítsanak elő.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás rekombináns és kiméra KS1/4 előállítására nem-limfoid sejtvonalakban, ezzel megkerülve azt a gyakori problémát, amely a heterológ antitestek kifejeződéséből származik limfoid sejtekben.

A jelen találmány leírás során a következő szakkifejezéseket használjuk.

- A - dezoxiadenozin
- Ala - alanin csoport
- Ap^R - ampicillin rezisztens fenotípus, vagy
a rezisztenciát kódoló gén maga
- Arg - arginin csoport
- Asn - aszparagin csoport
- Asp - aszparaginsav csoport
- C - dezoxicitozin

Kiméra antitest - olyan antitest, amely egy fajból, tipikusan egérből származó varábilis régiót tartalmaz, egy második és különböző fajból, célszerűen emberből származó konstans régióhoz kapcsolva

- Cys - cisztein csoport
- dhfr - dihidrofolát reduktáz fenotípus, vagy
a kódoló gén maga
- Enh - BK vírusból származó erősítő szekvencia
- G - dezoxiguanozin

Gln	- glutamin csoport
Glu	- glutaminsav csoport
Gly	- glicin csoport
G418 ^R	- G418 rezisztencia fenotípus, vagy a rezisztenciát kódoló gén maga. Jelölhető Km ^R -rel is.
His	- hisztidin csoport
Hm ^R	- higromicin rezisztencia fenotípus vagy rezisztenciát kódoló gén maga
Ile	- izoleucin csoport
IVS	- intront kódoló DNS.
KSA	- UCLA-P3 sejtek ~ 40 000 dalton méretű sejt-felületi glikoprotein antigénje, amelyet a KS1/4 monoklonális antitest felismer.
KS1/4	- hibridoma sejtvonalból származó monoklonális antitest, amely felismer P3-UCLA sejtek sejt-felületén található ~ 40 000 dalton méretű glikoprotein antigént
Leu	- leucin csoport
LP	- az adenovirus késői promoterének promoter aktivitását hordozó DNS darab
Lys	- lizin csoport
Met	- metionin csoport
MoAB	- monoklonális antitest.

- Naszcentsz fehérje - egy mRNS-ről transzlációval keletkező polipeptid, bármely poszt-transzlációs módosítás előtt
- pA - poliadenilezési szignált kódoló DNS- szekvencia
- Phe - fenilalanin csoport
- pL - a lambda bakteriofág baloldali promoterének promoter aktivitását hordozó DNS szakasz
- Pro - prolin csoport
- Promoter - olyan DNS szekvencia, amely a DNS RNS-sé való átírását irányítja.

Rekombináns DNS klónozó vektor - bármely önálló replikációra képes ágens, ideértve de nem korlátozva magunkat plazmidokra és fágokra, ami olyan DNS molekula, amihez egy vagy több DNS-szakaszt lehet hozzáadni vagy adtak hozzá.

Rekombináns DNS expressziós vektor - bármely rekombináns DNS klónozó vektor, amelybe promotert építettek be.

Rekombináns KS1/4 - KS1/4 expresszióra képes vektorral transzformált sejtekben expresszáldott KS1/4 monoklonális antitest.

Replikon - olyan DNS szekvencia, amely szabályozza és lehetővé teszi plazmid vagy más vektor

autonóm replikációját

Restrikciós fragment - bármely lineáris DNS szakasz, amely egy vagy több restrikciós endonukleáz enzim hatására jön létre.

Érzékeny gazdasejt - olyan gazdasejt amely nem képes adott antibiotikum vagy más toxikus anyag jelenlétében növekedni, az adott anyag elleni rezisztencia-tulajdonságot kódoló DNS szakasz nélkül

Ser - szerin csoport

Strukturgén - bármely funkcionális polipeptidet kódoló

DNS szakasz, beleértve a transzlációs start és stopjeleket

T - dezoxitimidin

Tc^R - tetraciklin - rezisztencia fenotípus, illetve az azt kódoló gén

Thr - treonin csoport

Trp - triptofán csoport

Tyr - tirozin csoport

Val - valin csoport

1. ábra: a pL32 plazmid készítésének sémája. A leírás céljai miatt az ábrák nem mérethelyesek.

2. ábra: a pNM 789 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

3. ábra: a 120-as plazmid készítésének sémája
4. ábra: a pL110-es plazmid készítésének sémája
5. ábra: a pBK neo 1 plazmid és a BK vírus restrikciós és funkcionális térképe
6. ábra: a pLP cat és a pBL cat plazmidok restrikciós és funkcionális térképe
7. ábra: a pL133 plazmid készítésének sémája
8. ábra: a pLPC, pSV2hyg és pLPChyg1 plazmidok restrikciós és funkcionális térképe
9. ábra: a pBW25 plazmid készítésének sémája
10. ábra: a pBW32 plazmid készítésének sémája
11. ábra: a pLPChd és phd plazmidok restrikciós és funkcionális térképe
12. ábra: a pGKC2310 és pG2A52 plazmidok restrikciós és funkcionális térképe
13. ábra: a CHKC2-6 és CHKC2-18 plazmidok restrikciós és funkcionális térképe
14. ábra: a CH2A5 és CH2A5FG2 plazmidok restrikciós és funkcionális térképe
15. ábra: a CH2A5IG3 és CH2A5IG4 plazmidok restrikciós és funkcionális térképe.

A jelen találmány tárgya olyan rekombináns DNS vegyület, amely monoklonális antitest könnyű láncát kódolja, amely könnyű lánc a KS1/4 monoklonális antitest könnyű láncá és lényegében a következő aminosav-sorrenddel rendelkezik:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
 Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr
 Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu
 Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
 Arg Asn Glu Cys

A jelen találmány tárgya továbbá olyan rekombináns DNS vegyület, amely monoklonális antitest nehéz láncát kódolja, amely nehéz lánc a KS1/4 monoklonális antitest nehéz láncá és lényegében a következő aminosav-sorrenddel rendelkezik:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys
Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu
Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln
Asn Met Arg Thr Met Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ser
Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys
Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser
Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe
Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

A jelen találmány tárgya a rekombináns monoklonális KS1/4 antitestek valamint a KS1/4 eddig ismeretlen aminosav és nukleotid szekvenciái. A DNS bázispár-képzés komplementer természetete miatt a kétszálu DNS molekula egyik láncának szekvenciája elég ahhoz, hogy a másik lánc szekvenciáját meghatározzuk. A KS1/4 könnyű láncának nukleotid szekvenciája a következő:

CAA ATT CTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT
 CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA
 AGT TAC ATG CTC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCG CCC AAA
 CCC TGG ATT TTT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA TTC CCT GCT
 CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ATA ATC
 AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG
 CGG AGT GGT TAC CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA
 ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA
 TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC
 TTG AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT
 GAT GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT
 CAG GAC AGC AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG
 TTG ACC AAG GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG
 GCC ACT CAC AAG ACA TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC
 AGG AAT GAG TGT

míg a KS1/4 nehéz láncának a nukleotid szekvenciája a következő:

CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG
AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT
ACC TTC ACA AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA GGA
AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC ACT GGA GAA
CCA ACA TAT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG
GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TTT TTG CAG ATT CAA CAA CCT CAG
AAT ATG AGG ACT ATG GCT ACA TAT TTC TGT GTA AGA TTT ATT TCT
AAG GGG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACG TCA GTC ACC GTC TCC TCA
GCC AAA ACA ACA GCC CCA TCG GTC TAT CCA CTG GCC CCT GTG TGT
GGA GAT ACA ACT GGC TCC TCG GTG ACT CTA GGA TGC CTG GTC AAG
GGT TAT TTC CCT GAG CCA GTG ACC TTG ACC TGG AAC TCT GGA TCC
CTG TCC AGT GGT GTG CAC ACC TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC
CTC TAC ACC CTC AGC AGC TCA GTG ACT GTA ACC TCG AGC ACC TGG
CCC AGC CAG TCC ATC ACC TGC AAT GTG GCC CAC CCG GCA AGC AGC
ACC AAG GTG GAC AAG AAA ATT GAG CCC AGA GGG CCC ACA ATC AAG
CCC TGT CCT CCA TGC AAA TGC CCA GCA CCT AAC CTC TTG GGT GGA
CCA TCC GTC TTC ATC TTC CCT CCA AAG ATC AAG GAT GTA CTC ATG
ATC TCC CTG AGC CCC ATA GTC ACA TGT GTG GTG GTG GAT GTG AGC
GAG GAT GAC CCA GAT GTC CAG ATC AGC TGG TTT GTG AAC AAC GTG
GAA GTA CAC ACA GCT CAG ACA CAA ACC CAT AGA GAG GAT TAC AAC
AGT ACT CTC CGG GTG GTC AGT GCC CTC CCC ATC CAG CAC CAG GAC
TGG ATG AGT GGC AAG GAG TTC AAA TGC AAG GTC AAC AAC AAA GAC
CTC CCA GCG CCC ATC GAG AGA ACC ATC TCA AAA CCC AAA GGG TCA
GTA AGA GCT CCA CAG GTA TAT GTC TTG CCT CCA CCA GAA GAA GAG
ATG ACT AAG AAA CAG GTC ACT CTG ACC TGC ATG GTC ACA GAC TTC
ATG CCT GAA GAC ATT TAC GTG GAG TGG ACC AAC AAC GGG AAA ACA
GAG CTA AAC TAC AAG AAC ACT GAA CCA GTC CTG GAC TCT GAT GGT
TCT TAC TTC ATG TAC AGC AAG CTG AGA GTG GAA AAG AAG AAC TGG
GTG GAA AGA AAT AGC TAC TCC TGT TCA GTG GTC CAC GAG GGT CTG
CAC AAT CAC CAC ACG ACT AAG AGC TTC TCC CGG ACT CCG GGT AAA

A jelen találmány tárgya továbbá rekombináns
DNS molekula, amely azzal jellemezhető, hogy kiméra

antitest könnyű láncát kódoló DNS, amely DNS egy könnyű láncot egy első emlős fajból származó antigén-specifikus variábilis régiót kódol, valamint egy második különböző emlős fajból származó konstans régiót, és az említett könnyű lánc variábilis régió aminosav-sorrendje a következő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 Ile Lys Arg

A könnyű lánc variábilis régió nukleotid szekvenciája a következő:

CAA ATT CTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT
 CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA
 AGT TAC ATG CTC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCG CCC AAA
 CCC TGG ATT TTT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA TTC CCT GCT
 CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ATA ATC
 AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG
 CGG AGT GGT TAC CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA
 ATA AAA CGT

A találmány foglalkozik még a fent leírt könnyű lánc variábilis régió származékaival, az egyik ilyen származék aminosav sorrendje a következő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys Gly

Ennek a könnyű lánc variábilis régió származéknak a nukleotid sorrendje a következő:

CAA ATT CTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT
CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA
AGT TAC ATG CTC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCG CCC AAA
CCC TGG ATT TTT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA TTC CCT GCT
CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ATA ATC
AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG
CGG AGT GGT TAC CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA
ATA AAA GGT

A találmány tárgya továbbá rekombináns DNS molekula, amely azzal jellemezhető, hogy kiméra antitest nehéz láncát kódoló DNS, amely DNS egy nehéz láncot, egy első emlős fajból származó nehéz lánc variábilis régiót kódol, valamint egy második különböző emlős fajból származó konstans régiót, és az említett nehéz lánc variábilis régió aminosav-sorrendje a következő:

- 16 -

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys
 Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
 Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu
 Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln
 Asn Met Arg Thr Met Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ser
 Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

Ennek a nehéz lánc variábilis régiónak a nukleotid szekvenciája a következő:

CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG
 AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT
 ACC TTC ACA AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG ACT CCA GGA
 AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC ACT GGA GAA
 CCA ACA TAT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG
 GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TTT TTG CAG ATT CAA CAA CCT CAG
 AAT ATG AGG ACT ATG GCT ACA TAT TTC TGT GTA AGA TTT ATT TCT
 AAG GGG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACG TCA GTC ACC GTC TCC TCA

A jelen találmány szerinti könnyű lánc és nehéz lánc molekulák egyaránt kapcsolódnak különböző szignál peptidekhez. Akönnnyű lánc szignálpeptidjének aminosav szekvenciája a következő:

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile
 Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly

A szignál peptid nukleotid szekvenciája a következő:
 ATG GAT ITT CAA GTG CAG ATT TTT AGC TTC CTG CTA ATC
 AGT GCT TCA GTC ATA ATG TCC AGA GGA

- 17 -

A nehéz lánc szignálpeptidjének aminosav sorrendje a következő:

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala
Ala Gln Ser Ala Gln Ala

Ennek a szignálpeptidnek a nukleotid szekvenciája a következő:

ATG GAT TGG CTG TGG AAC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT
GCC CAA AGT GCC CAA GCA

A jelen találmány szerinti új DNS vegyületek cDNS klónokból származnak, amelyeket a KS1/4 monoklonális antitesteket termelő hibridóma sejt vonal mRNS-éből állítunk elő. A pGKC2310 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest könnyű láncának teljes kódoló szakaszát, a könnyű lánchoz kapcsolódó szignálpeptidet kódoló szakaszt, valamint a molekula 5' és 3' nem-transzlálódó régióját.

Az 5' nem-transzlálódó régió DNS szekvenciája:

5'-TC TGA CAG ACA CTA CTG TGC CTC GTC GGT TGG GAC CTA AAA GGG
CTA GTA GAA TCC GCA AGC TTT TTA ATC TCT CCA AAG AAG ATG ATG
TCC GCC AGT ATG TTG TCA GGA AGC CCT TAA ACA AAG AAG GTA ATT
AGC TAG GGA CCA AAA TTC AAA GAC AAG-3'

míg a 3' nem-transzlálódó régió DNS szekvenciája:

5'-TAG AGA CAA AGG TCC TGA GAC GCC ACC ACC AGC
TCC CCA GCT CCA TCC TAT CTT CCC TTC TAA GGT CTT GGA GGC TTC
CCC ACA AGC GAC ATA CCA CTG TTG CGG TGC TCC AAA CCT CCT CCC
CAC CTC CTT CTC CTC CTC CTC CCT TTC CTT GGC TTT TAT CAT GCT
AAT ATT TGC AGA AAA TAT TCA ATA AAG TGA GTC TTT GCA CTT G-3'

A pGKC2310 plazmidot szokásos módon lehet E.coli K12 MM294/pGKC2310 törzsből izolálni, amely törzs a Northern Regional Research Laboratory (NRRL) Peoria, Illionis törzsgyűjteményben lett letétbe helyezve 1989. április 1-jén és lett az állandó törzs gyűjtemény része. Az E.coli K12 MM294/pGKC2310 törzs tenyészetét az NRRL-től lehet beszerezni B-18356 sorszám alatt. A pGKC2310 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, a 12. ábrán mutatjuk be.

A pG2A52 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest nehéz láncának teljes kódoló szekvenciáját, a nehéz lánchoz kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciáját, valamint a molekula 5' és 3' nem-transzlálódó régióit. A molekula által kódolt nehéz lánc IgG2A alosztályba tartozik. Az 5' nem-transzlálódó régió DNS szekvenciája:

5'-TCG TTT GTC TTA AGG CAC CAC TGA GCC CAA GTC TTA GAC ATC-3'

míg a 3' nem-transzlálódó régió DNS-szekvenciája:

5'-TGA GCT CAG CAC CCA CAA AAC TCT CAG GTC CAA AGA GAC ACC CAC
ACT CAT CTC CAT GCT TCC CTT GTA TAA ATA AAG CAC CCA GCA ATG
CCT GGG ACC ATG TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AGA GG-3'

A pG2A52 plazmidot szokásos módon lehet E.coli K12 MM294/pG2A52 törzsből izolálni, amely törzs az NRRL törzsgyűjteménynél lett letétbe helyezve 1988. április 1-én és lett az állandó törzsgyűjtemény része. Az E.coli K12 MM294/pG2A52 törzs tenyészetét az NRRL-től lehet beszerezni NRRL B-18357 sorszám alatt. A pG2A52 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 12. ábrán mutatjuk be.

A CHKC2-6 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest természetes könnyű láncu variábilis régióját kódoló cDNS szekvenciát, a könnyű lánchoz kapcsolódó szignál szekvenciát kódoló cDNS-t valamint a humán immunoglobulin könnyű láncu régiójának genomiális DNS szekvenciáját. A CHKC2-6 plazmidot szokásos módon izolálhatjuk E.coli K12 DH5/CHKC2-6 törzsből, amelyet szintén letétbe helyeztek az NRRL-nél 1988. április 1-jén és az állandó törzsgyűjtemény része lett. Az E. coli K12 DH5/CHKC2-6 tenyészet NRRL-B 18358 sorszám alatt szerezhető be az NRRL-től. A CHKC2-6 plazmid restrikciós és funkcionális a kísérő rajzok között a 13. ábrán mutatjuk be.

A CHKC2-18 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest könnyű láncu variábilis régiójának egy származékát kódoló cDNS szekvenciát, a könnyű lánchoz kapcsolódó szignál peptidet kódoló cDNS szekvenciát és a humán

immunoglobulin könnyű lánc konstans régióját kódoló genomiális DNS-t. Ennek a szekvenciának egy variánsa tartalmazza a kodon megváltoztatását a 3' végen. A természetes könnyű láncu variábilis régió a 3' végen egy arginin kodont tartalmaz, míg a CHKC2-18 plazmidban az azonos pozícióban lévő kodon glicin csoportot kódol. A CHKC2-18 plazmidot szokásos módon lehet izolálni E.coli K12 DH5/CHKC2-18 törzsből, amelyet szintén letétbe helyeztek az NRRL-nél 1988. április 1-jén és az állandó törzsgyűjtemény része lett. Az E.coli K12 DH5/CHKC2-18 törzs tenyészetét NRRL B-18359 sorszám alatt lehet az NRRL-től beszerezni. A CHKC2-18 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 13. ábrán mutatjuk be.

A CH2A5 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest nehézláncu variábilis régióját kódoló cDNS szekvenciát az említett nehéz lánchoz kapcsolódó szignál peptidet kódoló cDNS kódoló szekvenciát, valamint az IgG1 humán immunoglobulin nehézláncu konstans régiójának genomiális DNS szekvenciáját. A CH2A5 plazmidot szokásos módon lehet izolálni E. coli K12 MM294/CH2A5 törzsből, amelyet szintén letétbe helyeztek az NRRL-nél 1988. április 1-jén és az állandó törzsgyűjtemény része lett. Az E. coli K12 MM294/CH2A5 törzs tenyészetét NRRL-

18360 sorszám alatt lehet az NRRL-től beszerezni.

A CH2A5 plazmid restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 14. ábrán mutatjuk be.

A CH2A5IG2 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest nehézláncu variábilis régióját kódoló cDNS-t a nehéz lánchoz kapcsolódó szignálpeptidet kódoló cDNS szekvenciát és az IgG2 humán immunoglobulin nehézláncu konstans régióját kódoló genomialis DNS szekvenciát. A CH2A5IG2 szokásos módon izolálható E.coli K12 DH5/CH2A5IG2 törzsből, amelyet szintén letétbe helyeztek az NRRL-nél 1988. április 1-jén és az állandó törzsgyűjtemény részévé tették. Az E.coli K12 DH5/CH2A5IG2 törzs tenyészetét NRRL B-18361 sorszám alatt lehet beszerezni az NRRL-től. A CH2A5IG2 plazmid restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 14. ábrán mutatjuk be.

A CH2A5IG3 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest nehézláncu variábilis régióját kódoló cDNS szekvenciát, a nehéz lánchoz kapcsolódó szignál peptidet kódoló cDNS szekvenciát, valamint az IgG3 humán immunoglobulin nehézláncu konstans régióját kódoló genomialis DNS szekvenciát. A CH2A5IG3 plazmidot szokásos módon lehet izolálni. E.coli K12 DH5/CH2A5IG3 törzsből, amelyet szintén letétbe helyeztek az NRRL-nél 1988. április 1-jén és az állandó törzsgyűjtemény részévé tették. Az E.coli K12 DH5/CH2A5/IG3 törzs tenyészetét NRRL B-18362 sorszám alatt

lehet beszerezni az NRRL-től. A CH2A5IG3 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 15. ábrán mutatjuk be.

A CH2A5IG4 plazmid tartalmazza a KS1/4 monoklonális antitest nehézláncu variábilis régióját kódoló cDNS szekvenciát, a nehéz lánchoz kapcsolódó szignálpeptidet kódoló cDNS szekvenciát és az IgG4 humán immunoglobulin nehézláncu konstans régióját kódoló genomiális DNS szekvenciát. A CH2A5IG4 plazmidot szokásos módon lehet izolálni E.coli K12 DH5/CH2A5IG4 törzsből, amelyet szintén letétbe helyeztek az NRRL-nél 1988. április 1-jén és az állandó törzsgyűjtemény részévé tették. Az E.coli K12 DH5/CH2A5IG4 törzs tenyészetét NRRL-B-18363 sorszám alatt lehet beszerezni az NRRL-től. A CH2A5IG4 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 15. ábrán mutatjuk be.

A jelen találmány szerinti, rekombináns KS1/4-et és származékait kódoló DNS vegyületek különösen előnyösen használhatók olyan vektorok előállítására, amelyekkel lehetséges emlős és más eukarióta sejtek transzformálása és különböző antitest láncok expressziója. Számos emlős gazdasejt rendelkezik a szükséges rendszerrel ahhoz, hogy a jelen találmány szerinti különböző antitest-láncok amino-terminális részén jelenlévő szignálpeptideket fel-

ismerje és megfelelően feldolgozza. Néhány emlős sejt képes a poszt-transzlációs módosításokra, például az antitest molekuláknál megfigyelt glikozilezésre. Eukarióta gazdasejtek transzformálására számos különböző vektor létezik, és az alábbiakban példaként bemutatott speciális vektorokkal nem szándékozunk korlátozni a jelen találmány oltalmi körét.

A jelen találmány szerinti expressziós vektorokat, amelyek a rekombináns KS1/4 és ennek kiméra származékai előállítását irányítják, phd plazmidok felhasználásával állítottuk elő. A phd plazmidot számos, közforgalomban lévő kiindulási anyagból állítottuk elő. A phd plazmid restriktációs és funkcionális térképet a kísérő rajzok között, a 11. ábrán mutatjuk be.

A phd plazmid előállítása első lépéseként a pKC283 plazmidot izoláljuk E.coli K12 BE1201/pKC283 törzsből. Ez a törzs NRRL B-15830 sorszám alatt érhető el az NRRL-nél (letétbe helyezve 1984 augusztus 3-án). A pKC283, plazmid egy, lambda bakteriofágból származó lpp-pL hibrid promotert tartalmaz. Ezt a plazmidot E.coli K12 BE1201 sejtekből lehet előállítani, mivel az a sejt tartalmaz egy, a sejt kromoszómális DNS-ébe integrálódott hőmérséklet-érzékeny CI represszort. A pKC283 plazmidból a szükségtelen lacZ részt kivágjuk, a plazmidot először PvuII restriktációs

enzimmel hasítva. Az emésztett DNS-hez ezután specifikus DNS-linkereket adunk, hogy a PvuII helyeket egyetlen XhoI helyé alakítsuk, így állítva elő a pKC283PX plazmidot. A pKC283 és pKC283PX plazmidok izolálásának részletes leírása az 1. illetve 2. példában található. A pKC283 és pKC283PX plazmidok restriktációs és funkciós térképét a kísérő rajzok között, az 1. ábrán mutatjuk be. A 3. példában leírtak szerint a pKC283PX plazmidot *E. coli* K12 MO (λ^+) törzsbe transzformáljuk. Az *E. coli* K12 MO (λ^+) törzs NRRL B-15993 sorszám alatt hozzáférhető az NRRL-nél (letétbe helyezve 1985 augusztus 14-én).

A pKC283 PX plazmidot ezután BglII és XhoI restriktációs enzimekkel emésztjük. A vektor tisztítása után BglII és XhoI végekkel rendelkező DNS linkereket ligálunk a vektorba, így kapjuk a pKC283-L plazmidot. A BglII-XhoI linker egy XbaI helyet is tartalmaz. A pKC283-L plazmid XhoI helyét ezután BamHI helyé alakítjuk. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy a pKC283-L plazmidot teljesen megemésztjük XhoI enzimmel, ezután Klenow polimerázzal kezeljük, majd BamHI linkereket adunk hozzá, így kapjuk a pKC283-LB plazmidot. A pKC283-L és pKC283-LB plazmidok készítésének részletes leírását

a 4. és 5. példákban mutatjuk be. A PKC283-L és pKC283-LB plazmidok restriktációs funkcionális térképét a kísérő rajzok között, az 1. ábrán mutatjuk be.

A pKC283PX plazmidból ezután kivégjük az idegen E. coli DNS-t SalI enzimmel való teljes emésztéssel, ezután a ~4,0 kb méretű vektort Klenow fragmenttel kezeljük, végül EcoRI linkereket adunk hozzá. Ligálással való visszazárás után kapjuk a pKC283PRS plazmidot. A pKC283PRS plazmidot ezután PstI és SphI restriktációs enzimekkel emésztjük és a ~0,85 kb méretű PstI-SphI restriktációs fragmentet izoláljuk. Analóg módon a pKC283-LB plazmidot PstI és SphI restriktációs enzimekkel emésztjük és a ~3,0 kb méretű fragmentet izoláljuk. A pKC283PRS-ből számos ~0,85 kb méretű PstI-SphI fragmentet a pKC283-LB ~3,0 kb méretű PstI-SphI vektor fragmentjébe klónozva kapjuk, a pL32 plazmidot. A pKC283PRS és pL32 plazmidok előállításának részletes leírása a 6. példában található. A pKC 283PRS és pL32 plazmidok restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán mutatjuk be.

Ezután a pNM789 plazmidot állítjuk elő E.coli K12RV308/pNM789 törzsből, amelyet 1987 május 4-én helyeztek letétbe az NRRL-nél B-18216 sorszám alatt. A pNM789 plazmid restriktációs és funkcionális térképet a kísérő rajzok között, a 2. ábrán mutatjuk be. A pNM789

plazmidot részlegesen emésztjük PvuII restrikciós enzimmal, teljesen megemésztjük BamHI restrikciós enzimmal, majd alkalikus foszfátazzal kezeljük. Ezután egy új PvuII - BamHI linkert ligálunk az emésztett, foszfátázozott pNM789 vektorba, így kapjuk a 120 jelű plazmidot. A 120 plazmidot ezután teljesen megemésztjük XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel és a $\sim 0,6$ kb méretű EK-BGH-t kódoló XbaI-BamHI fragmentet izoláljuk. A pL32 plazmidot szintén megemésztjük XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel és a $\sim 3,9$ kb méretű vektor-fragmentet izoláljuk. A 120 plazmid $\sim 0,6$ kb méretű XbaI-BamHI fragmentjét ezután a pL32 plazmid $\sim 3,9$ kb méretű vektor-fragmentjébe ligálva kapjuk a pL47 plazmidot. A 120 és pL47 plazmidok előállításának részletes leírását a 6. és 7. példában közöljük. A 120 és pL47 plazmidok restrikciós és funkciós térképét a 3. és 4. ábrán közöljük a kísérő rajzok között.

A pR12 plazmid tartalmazza a cI857 hőmérséklet-érzékeny pL represszor gént és a pBR322-ből származó tetraciklin rezisztencia gént. A pPR12 jelű plazmidot a 4 436 815 sorszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabaddalme leírásban írják le és igénylik (1984 március 13.). A pPR12 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 4. ábrán mutatjuk be. Az EcoRI hasítási helyet eltávolítjuk a pPR12 plazmidból először teljesen

megemésztve a plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel, majd Klenow fragmenttel kezelve. A vektort ezután ligálással visszazárjuk, így kapjuk a pPR12 Δ R1 plazmidot. A pPR12 Δ R1 plazmidot ezután AvaI restrikciós enzimmel emésztjük, majd Klenow fragmenttel kezeljük. Az AvaI enzimmel emésztett, Klenow framgenttel kezelt pPR12 Δ R1 plazmidot EcoRI linkerekhez ligáljuk, majd recirkularizálva kapjuk a pPR12AR1 plazmidot. A pPR12A1 plazmid készítésének részletes leírását a 8. példában adjuk meg. A pPR12AR1 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között, a 4. ábrán adjuk meg.

A $\sim 2,9$ kb méretű PstI-EcoRI fragmentet izoláljuk a pPR12AR1 plazmidból, miután a plazmid DNS-t PstI és EcoRI restrikciós enzimekkel emésztettük. A pL47 plazmidot PstI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a $\sim 2,7$ kb méretű PstI-BamHI restrikciós fragmentet izoláljuk. Egy külön reakcióban a pL47 plazmidot EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük és a $\sim 2,03$ kb méretű EcoRI-BamHI fragmentet izoláljuk. A pL47 plazmidból származó $\sim 2,7$ kb méretű PstI-BamHI és a $\sim 1,03$ kb méretű EcoRI-BamHI restrikciós fragmentet a pPR12AR1 plazmidból származó $\sim 2,9$ kb méretű PstI-EcoRI restrikciós fragmenthez ligálva kapjuk a pL110 jelű plazmidot. A pL110 plazmid készítésének rész-

letes leírását a 9. példában mutatjuk be. A pL110 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 4. ábrán mutatjuk be.

A jelen találmány szerinti BK erősítő (enhancer)-típusú vektor tartalmaz egy BK erősítő-adenovírus késői promoter kazettát, plusz egy higromicin rezisztenciát kódoló gént és egy rágcsáló dihidrofolát-reduktáz (dhfr) gént. A BK vírus erősítő és az adenovírus késői promoter lényegesen megnöveli egy rekombináns gén transzkripcióját eukarióta gazdasejtekben. A higromicin rezisztenciát kódoló gén eukarióta sejtekben használható szelekciós markerként van jelen. A rágcsáló dihidrofolát reduktáz gén megfelelő körülmények között amplifikálódik a gazda kromoszómában. Ez az amplifikálódás, melyet Schimke ír le egy review-ban [Cell, 37, 705-713 (1984)] olyan DNS szekvenciákat is érinthet, amelyek szoros közelségben vannak a dhfr génnel. A dhfr gén szelektálható marker dhfr-negatív sejtekben és arra használható, hogy a DNS szegment kópia-számát megnövelje, a gazdasejtet fokozatosan növekvő koncentrációju metotrexát hatásának kitéve.

A pLPChd plazmidot használhatjuk eukarióta expressziós vektor előállítására, a jelen találmány szerinti új KS1/4 expresszálása céljából. A pLPC hd plaz-

tartalmazza a dhfr gént, az adenovirus 2-es típusu promoterét és a BK virus erősítőt. A BK virust, amely a BK virus erősítőt tartalmazza, megvásárolhatjuk, vagy könnyen nagymennyiségben előállíthatjuk a 10. példában leírtak szerint. A BK virus hozzáférhető még ATCC VR-837 sorszám alatt az American Type Culture Collection-nál. A BK virus restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, az 5. ábrán mutatjuk be.

A BK virális genomot a pdBPV-MMTneo gén egy részével kombinálva állítjuk elő a pBKneo1 és pBKneo2 plazmidokat. A pdBPV-MMT neo plazmid, amely körülbelül 15 kb méretű és ATCC 37224 sorszám alatt hozzáférhető az ATCC-nél, tartalmazza a pBR322-ből származó replikont és béta-laktamáz gént, az egér metallotionein promotert olyan pozícióban, hogy egy neomicin rezisztencia enzimet kódoló gén expresszióját irányítsa, valamint egy $\sim$ 8 kb méretű szarvasmarha papillóma vírus (BPV) DNS-t. A pdBPV-MMT neo plazmidot BamHI restrikciós enzimmel emésztve két fragment keletkezik, egy $\sim$ 8 kb méretű a BPV DNS-t tartalmazó fragment, és egy $\sim$ 7 kb méretű fragment, amely a többi említett szekvenciákat tartalmazza. A BK vírusban csak egy BamHI restrikciós hasítási hely van, és a pBKneo1 illetve pBKneo2 plazmidokat úgy állítjuk elő, hogy a pdBPV-MMTneo plazmid $\sim$ 7 kb

méretű BamHI restrikciós fragmentjét BamHI restrikciós enzimmel linearizált BK vírus DNS-hez ligáljuk. A pBK neo1 és pBK neo2 plazmidok előállítását (amelyek csak a BK vírus DNS orientációjában különböznek egymástól), a 11. példában írjuk le. A pBKneo1 egy 2,1 kb méretű SalI-HindIII fragmentet tartalmaz, míg a pBKneo2 egy $\sim 1,0$ kb méretű restrikciós fragmentet tartalmaz. A pBKneo1 restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, az 5. ábrán mutatjuk be.

Mind a pBKneo1 és mind a pBKneo2 plazmid tartalmazza a BK vírus teljes genomját, beleértve az erősítő szekvenciát, így megfelelő kilindulási alapként szolgálnak a jelen találmány szerinti expressziós vektorhoz.

Az expressziós vektor, a pBLcat plazmid egymás utáni elrendezésben tartalmazza a BK erősítő szekvenciát a humán adenovirus 2-es típusu késői promoterrel, amelynek olyan az elhelyezése, hogy a kloramfenikol acetiltranszferáz enzim (CAT) expresszióját irányítja. A pSV2cat plazmid megfelelő forrása a CAT génnek és ATCC 37155 sorszám alatt hozzáférhető az ATCC-nél. A humán adenovirus 2-es típusu DNS kereskedelmi forgalomban kapható, valamint ATCC VR-2 sorszám alatt hozzáférhető az ATCC-nél.

A jellemző pBLcat plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a humán adenovírus 2-es típusu DNS késői promoterét tartalmazó ~0,32 kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragmentet tompavégű BclI linkerekhez kapcsoljuk, amelyek az AccI-PvuII restrikciós fragm^{nt}nek csak a PvuII végéhez kapcsolódnak. A kapott fragmentet ezután a pSV2cat plazmidból származó ~4,51 kb méretű AccI-StuI restrikciós fragmenthez kapcsoljuk, így kapjuk a pLBcat intermediér plazmidot. A kívánt pBLcat plazmidot úgy állítjuk elő, a pLPcat plazmidból, hogy a BK vírus DNS-ének replikációt és erősítő szekvenciát tartalmazó ~1,28 kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragmentjét a pLPcat plazmid ~4,81 kb méretű AccI-StuI restrikciós fragmentjéhez ligáljuk. A pBLcat plazmid előállítását a 12.példában írjuk le. A pLPcat és a pBLcat plazmidok restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 6. ábrán mutatjuk be.

Ezután a pPL133 plazmidot állítjuk elő a pH7, pSV2gpt és pSV2-béta-globin plazmidokból. A pH7 plazmid egy humán C fehérjét kódoló DNS szekvenciát tartalmaz. A pH7 plazmidot az E.coli K12RR1/pH7 törzsből állíthatjuk elő, amely NRRL B-15926 sorszám alatt hozzáférhető az NRRL-nél (letétbe helyezve 1985. január 29-én). A pH7 plazmidot BanI restrikciós enzimmel emésztjük, és egy ~1,25 kb méretű restrikciós fragmentet izolálunk.

A pHC7 plazmidot ezután PstI restrikciós enzimmal hasítjuk, majd egy $\sim 0,88$ kb méretű restrikciós fragmentet izolálunk, linkereket adunk hozzá, majd a fragmentet újra hasítjuk ApaI és BglII restrikciós enzimekkel, majd a $\sim 0,19$ kb méretű ApaI-BglII restrikciós fragmentet izoláljuk. A pSV2gpt plazmidot (ATCC 37145) HindIII és BglII restrikciós enzimekkel hasítjuk, majd egy $\sim 5,1$ kb méretű fragmentet izolálunk. Az $\sim 1,23$ kb méretű HindIII-ApaI restrikciós fragmentet és a $\sim 5,1$ kb méretű HindIII-BglII fragmentet összeligálva kapjuk a pSV2-HPC8 intermedier plazmidot. A pSV2-HPC8 plazmid előállításának részletes magyarázatát a 13. példában adjuk meg. Ennek a konstrukciónak a sémáját a kísérő rajzok között a 7. ábrán mutatjuk be.

A pSV2-HPC8 plazmidot ezután HindIII és SalI restrikciós enzimekkel hasítjuk, majd a $\sim 0,29$ kb méretű restrikciós fragmentet izoláljuk. Hasonlóképpen a pSV2-HPC8 plazmidot és hasítjuk BglII és SalI restrikciós enzimekkel, majd a $\sim 1,15$ kb méretű restrikciós fragmentet izoláljuk. A pSV2-béta-globin plazmidot (NRRL B-15928, letétbe helyezve 1985 január 29-én) BglII és HindIII restrikciós enzimekkel hasítjuk, és a $\sim 4,2$ kb méretű restrikciós fragmentet izoláljuk. Ezt a három fragmentet összeligálva kapjuk a pPL133 plazmidot. A pPL133 plazmidot HindIII restrikciós enzimmal hasítjuk, majd alkalikus foszfátazzal kezeljük. A pBLcat plazmidot is hasít-

juk HindIII restrikciós enzimmal és a $\sim 0,87$ kb méretű restrikciós fragmentet izoláljuk. Ezt a fragmentet ligáljuk a HindIII-mal hasított, foszfatáz²⁹olt pPL133 vektorba, így kapjuk a pLPC plazmidot. Mivel a pBLCat HindIII fragment két orientációban épülhet a pPL133 plazmidba, meg kell jegyeznünk, hogy pLPC alatt azt a plazmidot értjük, amelyben egy $\sim 1,0$ kb méretű NdeI-StuI fragment megléte bizonyítja a helyes orientációt.

A pLPC plazmid a pL133 plazmidhoz hasonlóan tartalmazza az erősítő szekvenciát, a korai és késői promotereket, T-antigén kötő helyeket valamint az SV40 replikációs origóját. A pL133 és pLPC plazmidok előállításának részletes leírását a 13. és 14. példában adjuk meg. A pL133 és pLPC plazmidok restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 7. és 8. ábrán adjuk meg.

A pLPC plazmidban az SV40 elemek szorosan egymás mellett találhatók, és nehéz elválasztani őket. A T-antigén kapcsolódása a T-antigén kötő helyhez, amely szükséges az SV40 replikációjához, ismert, hogy meggyorsítja a transzkripciót az SV40 késői promoteréről, és meglepő módon hasonló hatással van a BK késői promoterre. Mivel az SV40 replikációs origót tartalmazó plazmidnak magas szintű T-antigén által vezérelt replikációja általában letális a gazdasejtre, ezért sem a pLPC sem a

pL133 plazmid nem marad fenn stabilan episzómális (extrakromoszómális) formában SV40 T-antigén jelenlétében, hanem a két plazmidnak inkább integrálódnia kell a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe hogy stabilan fennmaradjanak. A BK erősítő régió teljes szerkezete nagyon hasonlít az SV40-ére, mivel a BK erősítő, a replikációs origó, a korai és késői promoterek, valamint a T-antigén kötő helyek BK analógja szintén egymás mellett található és nehéz elválasztani a BK vírus DNS-en. Ha azonban BK T-antigén jelenlétében növekszik a plazmid, amely a BK replikációs origót és T-antigén kötőhelyet tartalmazza, akkor nem replikálódik olyan mértékig, amely létálisnak bizonyul, és stabilan fennmarad episzómális formában a gazdasejtben. Ezenkívül a T-antigén által vezérelt replikációt használhatjuk a BK replikációs origót tartalmazó vektor kópiaszámának növelésére, oly módon, hogy szelekciós nyomás hatására több plazmid-kópia épül be a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe. Valószínűleg a BK és SV40 T-antigének és megfelelő kötőhelyek közötti hasonló szerkezet-funkció összefüggés miatt a BK replikációt is stimulálja az SV40 antigén.

A rekombináns DNS expressziós vektor episzómális formában való fennmaradása nem mindig előnyös a gazdasejt kromoszómájába való integrálódással szemben.

Azonban egy eukarióta sejtekben is működő szelekciós marker hiánya miatt a pLPC plazmida kapott stabil eukarióta transzformánsok azonosítása nehéz, ha csak a pLPC plazmidot nem transzformáljuk más, szelekciós markert tartalmazó plazmiddal. Emiatt a pLPC plazmidot módosítottuk, hogy eukarióta gazdasejtekben szelektálható származék plazmidokat kapjunk. Ezt úgy végezzük, hogy a pLPC plazmidot egy higromicin rezisztencia gént tartalmazó plazmid, a pSV2 hyg egy részéhez ligáljuk. A pSV2 hyg plazmidot NRRL B-18039 sorszám alatt szerezhettük be a Northern Regional Research Laboratory-tól (NRRL) (letétbe helyezve 1986 február 11-én). pSV2 hyg plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 8. ábrán mutatjuk be.

A pSV2 hyg plazmidot BamHI restrikciós enzimmel emésztjük, majd a $\sim 2,5$ kb méretű BamHI restrikciós fragmentet izoláljuk, amely a teljes higromicin-rezisztencia gént tartalmazza, majd Klenow enzymmel kezeljük (az E.coli DNS polimeráz I-ből szubtilizines hasítással előállítható nagy fragment) és a Klenow fragmenttel kezelt $\sim 5,82$ kb méretű pLPC NdeI-StuI restrikciós fragmenthez ligáljuk, így kapjuk a pLPC hyg1 és pLPC hyg2 plazmidokat. A pLPChyg1 és pLPChyg2 csak higromicin rezisztencia fragment orientációjában különböznek egymástól. A pLPChyg1 plaz-

mid egy $\sim 5,0$ kb méretű HindIII fragmentet tartalmaz, míg a pLPChyg2 plazmid egy $\sim 1,0$ kb méretű fragmentet. A pLPChyg1 és pLPChyg2 plazmidok előállításának leírása a 15. példában található. A pLPChyg1 és pLPChyg2 restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 8. ábrán közöljük.

Ezután a rágcsló dihidrofolát-reduktáz (dhfr) gént tartalmazó pBW32 plazmidot állítjuk elő. A pPA102 plazmidot (NRRLB-15834; letétbe helyezve 1984 augusztus 10-én) Tth111I restrikciós enzimmal hasítjuk és a $\sim 4,4$ kb méretű restrikciós fragmentet izoláljuk. Ezt a fragmentet Klenow enzimmal kezeljük, linkert adunk hozzá, majd a fragmentet HindIII és BamIII restrikciós enzimekkel kezelve egy $\sim 2,0$ kb méretű restrikciós fragmentet kapunk. A pRC plazmidot állítjuk elő a pTPA102 plazmidból származó, ~ 288 bp méretű ClaI-EcoRI restrikciós fragmentet ClaI-EcoRI enzimekkel hasított pKC7 vektorba ligálva. A pKC7 plazmid ATCC 37084 sorszám alatt hozzáférhető az ATCC-nél. A pRC plazmidot BamHI és HindIII restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a fenti, pTPA102 plazmidból származó $\sim 2,0$ kb méretű restrikciós fragmenthez ligálva kapjuk a pTPA103 plazmidot. A pTPA103 plazmid előállítási eljárását a 16A. példában közöljük. Ennek az eljárásnak

a sémáját a kísérőrajzok között a 9. ábrán mutatjuk be.

A pTPA103 plazmidot BglII restrikciós enzimmel emésztjük, Klenow fragmenttel kezeljük, majd NdeI linkereket adunk hozzá. Ezt a keveréket ligálva kapjuk a pTPA103 der NdeI plazmidot. A pTPA103der-NdeI plazmidot AvaII restrikciós enzimmel hasítjuk, majd egy $\sim 1,4$ kb méretű fragmentet izolálunk. Ezt a fragmentet Klenow enzimmel kezeljük, majd HpaI linkerek hozzáadása után EcoRI restrikciós enzimmel hasítjuk. A ~ 770 bp méretű, trpO-t és a TPA aminoterminális végét tartalmazó fragmentet EcoRI-SmaI enzimekkel emésztett pUC19 vektorba ligálva kapjuk a pUC19 TPAFE vektort. ApUC19TPAFE plazmidot részlegesen emésztjük HpaI restrikciós enzimmel, majd teljesen megemésztjük BamHI restrikciós enzimmel. A kapott $\sim 3,42$ kb méretű HpaI-BamHI restrikciós fragmentet ezután a pTPA103 plazmidból származó $\sim 1,015$ kb méretű ScaI-BamHI fragmenthez ligálva kapjuk a pBW25 plazmidot. A pBW25 plazmid előállítási eljárását a 16B példában írjuk le. Ennek az eljárásnak a sémáját a kísérő rajzok között a 9. ábrán közöljük.

A pBW25 plazmidot HindIII és EcoRI restrikciós enzimekkel hasítva, majd a kapott ~ 810 bp méretű fragmentet HindIII-EcoRI enzimekkel hasított M13mp8

fágba (New England Biolabs) ligálva kapjuk a pM8BW26 fágot. A pM8BW26 fágon ezután egy in vitro mutagenézis reakciót végzünk (aminosavakat kódoló DNS-t hasítva ki), így kapjuk a pM8BW27 fágot. A pM8BW27 fágot EcoRI és NdeI restrikciós enzimekkel hasítva kapjuk a ~560 bp méretű restrikciós fragmentet. Egy ~48 bp hosszúságú NdeI-XbaI linkert állítunk elő kémiai szintézissel. A pTPA103 plazmidot ezután EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük és egy ~689 bp méretű fragmentet izolálunk. A 9. példa szerint előállított pL110 plazmidot részlegesen emésztjük BamHI restrikciós enzimmal, majd teljesen emésztjük XbaI enzimmal és egy ~6,0 kb méretű fragmentet izolálunk. Ezt a ~6,0 kb méretű vektor fragmentet a pTPA103 ~689 bp méretű fragmentjét, a pM8BW27 fág ~560 bp méretű fragmentjét és a ~48 bp méretű linkert összeligálva kapjuk a pBW28 plazmidot. A pBW28 plazmid előállítását a 16C. példában írjuk le. Ennek az eljárásnak a sémáját a kísérő rajzok között a 10. ábrán mutatjuk be.

Ezután a pTPA301 plazmidot állítjuk elő a ~2,0 kb méretű HindIII-BglII pTPA103 fragmentet a pSV2-béta-globin plazmid ~4,2 kb méretű HindIII-BglII fragmentjéhez ligálva. A pSV2-dhfr plazmidot (ATCC37146) PvuII restrikciós enzimmal hasítjuk. BamHI linkerek hozzáadását követően a ~1,9 kb méretű dhfr gén tartalmu

fragmentet BamHI-gyel hasított, foszfatázozott pTPA301 plazmidba építjük, így kapjuk a pTPA303 plazmidot. A pTPA301 plazmidot EcoRI és BglII restrikciós enzimekkel emésztve kapunk egy $\sim 2,7$ kb méretű fragmentet. A pTPA303 plazmidot ezután HindIII és EcoRI restrikciós enzimekkel hasítjuk, így kapunk egy ~ 2340 bp méretű dhfr gént tartalmazó fragmentet. A pTPA 303 plazmidot HindIII és SstI restrikciós enzimekkel hasítva kapunk egy $\sim 1,7$ kb méretű fragmentet. A pBW28 plazmidot XhoII és SstI enzimekkel hasítva egy ~ 680 bp méretű fragmentet kapunk. A pTPA301 plazmidból származó $\sim 2,7$ kb méretű EcoRI-BglII fragmentet, a pTPA303 plazmidból származó ~ 2340 bp méretű HindIII-EcoRI fragmentet, a pTPA303-ból származó $\sim 1,7$ kb méretű HindIII-SstI fragmentet és a pBW28 plazmidból származó ~ 680 bp méretű XhoII-SstI fragmentet összeligálva kapjuk a pBW32 plazmidot. A pBW32 plazmid előállítási eljárását a 16D. példában írjuk le. Az eljárás sémáját a kísérő rajzok között a 10. ábrán mutatjuk be.

A pBW32 plazmid $\sim 1,9$ kb méretű, dhfr gént tartalmazó BamHI fragmentjét izoláljuk, Klenow enzimmal kezeljük, majd EcoRI restrikciós enzimmal részlegesen emésztett pLPChyg1 plazmidba építjük be, így kapjuk a pLPChd1 és pLPchd2 plazmidokat. A pLPChyg1

plazmid két EcoRI restrikciós enzim felismerési helyet tartalmaz, az egyiket a higromicin rezisztencia génben a másikat a pBR322 eredetű szekvencia részben. A dhfr gént tartalmazó fragmentet a pLPChyg1 plazmid pBR322 eredetű szekvenciájában lévő EcoRI helyre klónozzuk, így kapjuk a pLPChd1 és pLPChd2 plazmidokat. A jelenleírás során a pLPChd1 plazmidot pLPChd plazmidnak nevezzük. A pLPChd plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 11. ábrán mutatjuk be. A pLPChd1 és pLPChd2 plazmidok konstrukcióját, amely csak a dhfr gént tartalmazó DNS szegment orientációjában különbözik, a 17. példában közöljük.

A phd plazmidot ezután úgy állítjuk elő, hogy a pLPChd plazmidot dam⁻ E.coli törzsebe transzformáljuk, majd onnan visszaizoláljuk. A pLPChd plazmidot ezután BclI restrikciós enzimmel emésztjük, és recirkularizálva kapjuk a phd plazmidot. A phd plazmid egy olyan delécióból származik, amely a pLPcat plazmid készítése során bevitt extra BclI linkerek, valamint a két szomszédos BclI restrikciós fragmentet távolítja el a pLPChd plazmidból, ~1,45 kb méretben. A KS 1/4 monoklonális antitest könnyű láncát kódoló teljes hosszúságú cDNSt tartalmazó DNS fragmentet a phd plazmidba ligálva kapjuk a pL-KSL expressziós vek-

tort. A pKGC2310 plazmid 1100 bázispár méretű EcoRI fragmentjét Klenow enzimmal kezeljük, BamHI linkerekhez kapcsoljuk, majd a BclI restrikciós enzimmal emésztett phd plazmidba ligáljuk. A phd és pL-KSL plazmid készítésének részletes leírását a 18. és 19. példában adjuk meg. A phd plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 11. ábrán adjuk meg.

A pH-KS plazmid egy jelen találmány szerinti vektor, amely a phd és pG2A52 plazmidból származik. A pG2A52 plazmid 1,6 kb méretű EcoRI fragmentjét izoláljuk, Klenow enzimmal kezeljük és BamHI linkereket kapcsolunk rá. Ez a fragment tartalmazza a KS 1/4 monoklonális antitest nehéz láncának teljes hosszúságú cDNS-ét. Ezt a fragmentet ezután BclI restrikciós enzimmal emésztett phd plazmidba ligálva kapjuk a pH-KS expressziós plazmidot. A pL-HD egy olyan expressziós vektor, amelyet a phd plazmidból és a CHKC2-18 jelű plazmidból állítunk elő, amely egy humán könnyű lánc-konstans régiójához kapcsolt KS1/4 könnyű lánc variábilis régió származékát kódoló DNS-t tartalmaz. A CHKC2-18 plazmid ~1,3 kb méretű FnuDII-HindIII fragmentjét izoláljuk és Klenow enzimmal kezeljük. Ezt a fragmentet BclI enzimmal emésztett, Klenow enzimmal kezelt phd plazmidba ligáljuk, így kapjuk a pL-HD

expressziós plazmidot. A pH-KS és pL-HD plazmid készítésének részletes leírását a 20. és 21. példában mutatjuk be.

A pL-HD2 egy expressziós vektor, amelyet a phd plazmidból állítunk elő valamint a CHKC2-6 plazmidból, amely egy humán könnyű lánc konstans régióhoz kapcsolt KS1/4 könnyű lánc variabilis régió természetes szekvenciáját kódoló DNS szakaszt tartalmaz. A CHKC2-18 plazmid $\sim 1,3$ kb méretű FnuDII-HindIII fragmentjét izoláljuk és Klenow enzimmel kezeljük. Ezt a fragmentet ligáljuk BclI restrikciós enzimmel emésztett phd plazmidba, így kapjuk a pL-HD2 expressziós plazmidot. A pH1-HD plazmidot, amely egy humán IgG1 konstans régiót kódoló genomális DNS-hez kapcsolt KS1/4 nehézláncu variabilis régiót kódoló cDNS-t tartalmaz, a phd és CH2A5 plazmidból állítjuk elő. A CH2A5-plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, Klenow fragmenttel kezeljük, majd BamHI linkerkehez kapcsoljuk. A plazmidot ezután BamHI restrikciós enzimmel kezeljük és egy $\sim 7,4$ kb méretű restrikciós fragmentet izolálunk. Ezt a fragmentet ligáljuk BclI restrikciós enzimmel emésztett phd plazmidhoz, így kapjuk a pH1-HD expressziós plazmidot. A pL-HD2 és pH1-HD plazmidok előállításának részletes leírását a 22. és 23. példákban közöljük.

A pH2-HD plazmidot, amely egy humán IgG2 konstans régiót kódoló genomialis DNS-hez kapcsolt KS1/4 nehéz-lánc variábilis régiót kódoló cDNS-t tartalmaz, phd és CH2AIG2 plazmidokból állítjuk elő. A CH2A5IG2 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, Klenow fragmenttel kezeljük, majd BamHI linkereket kapcsolunk hozzá. Ezután a plazmidot BamHI restrikciós enzimmel kezeljük egy $\sim 6,1$ kb méretű restrikciós fragmentet izolálunk. Ezt a fragmentet ligáljuk BclI restrikciós enzimmel emésztett phd plazmidba, így kapjuk a pH2-HD expressziós plazmidot. A pH3-HD plazmidot, amely humán IgG3 konstans régiót kódoló genomialis DNS-hez kapcsolt KS1/4 nehéz lánc variábilis régiót kódoló cDNS-t tartalmaz, phd és CH2A5IG3 plazmidból állítjuk elő. A CH2AIG3 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, Klenow fragmenttel kezeljük, majd BamHI linkerekhez kapcsoljuk. A plazmidot ezután BamHI restrikciós enzimmel emésztjük és egy $\sim 7,4$ kb méretű restrikciós fragmentet izolálunk. Ezt a fragmentet BclI restrikciós enzimmel emésztett phd plazmidba ligáljuk, így kapjuk a pH3-HD expressziós plazmidot. A pH2-HD és pH3-HD plazmidok részletes előállítási leírását a 24. és 25. példákban közöljük.

A pH4-HDplazmidot, amely humán IgG4 konstans régiót kódoló genomialis DNS-hez kapcsolt KS1/4

nehéz lánc variábilis régiót kódoló cDNS-t tartalmaz, phd és CH2A5IG4 plazmidokból állítjuk elő. A CH2A5IG4 plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, Klenow fragmenttel kezeljük, majd BamHI linkerekkel kapcsoljuk. A plazmidot ezután BamHI restrikciós enzimmel emésztjük és egy $\sim 6,4$ kb méretű restrikciós fragmentet izolálunk. Ezt a fragmentet ligáljuk BclI restrikciós enzimmel emésztett phd plazmidba, így kapjuk a pH4-HD expressziós plazmidot. Az előállítás részletes leírását a 26. példában közöljük.

A jelen találmány semmiképpen sem korlátozódik a bemutatott eukarióta promoterek használatára. Más promoterek, úgymint a homológ és heterológ immunoglobulin promoterek, az SV40 késői promotor, vagy eukarióta gének promotere, úgymint például az ösztrogén-indukálható csirke ovalbumin gén, az interferon gén, a glükokortikoid indukálható tirozin-aminotranszferáz gén, a timidin-kináz gén, a fő korai adenovirus gén, és az SV40 korai promotere könnyen izolálható és módosítható, eukarióta gazdasejtekben antitestek előállítására tervezett rekombináns DNS expressziós vektorokban való felhasználásra. Eukarióta promoterek is használhatók tandem elrendezésben ilyen antitestek expressziójának irányítására. Továbbá nagyszámu retrovirusról ismert, hogy igen sokféle eukarióta gazdasejtet

képes megfertőzni. A retrovirus DNS-ben lévő hosszú ismétlődő végszakaszok gyakran promoter aktivitást kódolnak, és a fent leírt BK erősítő-adenovirus késői promotere helyett használható KS1/4 és származékai expressziójának vezérlésére. A jelen szabadalmi leírás nem korlátozódik továbbá a példaként említett plazmidokban példaként szereplő aktuális szelekciós markerekre. Nagyszámu különböző szelekciós marker létezik, mind eukarióta, mind prokarióta gazdasejtek számára, amelyek használhatók a jelen találmány szerinti DNS molekulát (szekvenciát) tartalmazó rekombináns DNS klónozó vagy expressziós vektorban.

A különböző expressziós vektorok transzformálhatók és expresszálhatók különböző eukarióta, főleg emlős gazdasejtekben. Az expressziós vektorok tartalmazznak E.coli replikációs origót, mivel általában E.coliból hatékonyabban lehet plazmid DNS-t izolálni, mint más gazdasejtekből. Antitestek expresszálódnak a gazdasejtekben, amelyekben az adott promoter az antitest strukturgén funkciójával kapcsolódik. A gyakorlott szakemberek számára nyilvánvaló, hogy számos eukarióta gazdasejt használható a különböző antitestek expresszálására a BK erősítő-adenovirus késői promotérének felhasználásával, ameddig a gazdasejt egy

nagy DNS-vírus azonnali-közeli géntermékét expresszálja. Mivel az azonnali-közeli génterméket akárhogy bejuttathatjuk a gazdasejtekbe, például plazmiddal vagy más vektorral való transzformáció útján, látszólag bármely eukarióta sejt használható a jelen szabadalomban leírt módszerrel. A jelen találmány szerinti eljárásban a humán sejtek az előnyös gazdasejtek, mivel a humán sejtek a BK vírus természetes gazdasejtjei és a BK erősített stimuláló sejt-faktorokat tartalmazhatnak. Míg humán sejtek használhatók gazdasejtként, az adenovírus 12-transzformált AV12 aranyhörcsög sejtvonala, amely az E1A génterméket expresszálja a legelőnyösebb, és ATCC CRL9595 sorszám alatt hozzáférhető az American Type Culture Collection-nál (Rockville, Maryland), letétbe helyezve 1987 november 24-én. A normál transzformációs eljárást részletesen a 27. példában írjuk le.

Egy immunoglobulin nehéz láncot kódoló expressziós vektorral transzformálva a AV12 sejtek szekretálják a processzált nehéz láncot a felülszóba. Azonban könnyű láncot kódoló expressziós vektorral transzformált AV12 sejtek nem szekretálják a könnyű láncot, hacsak a sejtek nincsenek ko-transzformálva nehéz láncot kódoló expresszió vektorral. A jelentálalmány szerinti különböző innumoglobulin láncokat expresszáló klónok izolálási eljárását a 28. példában mutatjuk be. Működőképes

KS1/4-et és származékait olyan AV12 sejtek felül-
uszójából lehet tisztítani, amelyek ko-transzformálva
lettek könnyű és nehéz láncot kódoló vektorokkal. Ily-
módon számos KS1/4 variánst lehet előállítani a jelen
találmány szerinti különböző könnyű és nehéz láncok
keverésével, összeillesztésével.

Az immunoglobulin könnyű- és nehéz-láncu
molekuláinak nem-limfoid rendszerben való expresszió-
ja sokkal előnyösebb mint a limfoid rendszerben való
expresszió. A monoklonális antitesteket hagyományosan
limfoid rendszerekből például mielóma vagyhibridóma sej-
tekből izolálják és tisztítják. Ezek a sejtek gyakran
expresszálnak nagymennyiségű heterogén antitestet.
Ennek a jelenségnek az a magyarázata, hogy a limfoid
sejtek maguktól is kiválasztanak antitesteket. Ha eltérő
antitestet kódoló DNS-sel transzformálják vagy eltérő an-
titestet termelő sejtekkel fuzionáltatják, akkor az
ilyen limfoid sejtek gyakran kettős kiválasztóvá vál-
nak. A kettős kiválasztó sejtvonalak számos hibrid mo-
lekuláris szerkezetű antitestet termelnek, amelyek jelen-
tős része nem kívánatos. Ezeket a nem-kívánt hibrideket
a terméktől ezután költséges és időigényes technikákkal
kell elválasztani. A jelen találmány szerinti eljárás
megkerüli a problémát, amennyiben a nem-limfoid sejtek

maguktól nem szekretálnak antitest molekulákat. Ennélfogva a felüluszóba szekretált egyetlen antitest a kívánt homogén termék.

A bemutatott DNS-szekvenciák és plazmidok számos módosítása, variációja lehetséges. Például a genetikai kód degeneráltsága lehetővé teszi a polipeptidet kódoló régiókban a nukleotidok helyettesítését, valamint a

```

  T A A
  | | |
  A T T

```

transzlációs stop-szignál helyettesítését

```

  TAG      vagy      TGA
  | | |      | | |
  ATC      ACT

```

transzlációs stop-szignálokkal. Ezeket a szekvenciákat meghatározhatjuk a KS1/4 immár ismert aminosav vagy DNS szekvenciájából, és ismert, szintetikus eljárásokkal állíthatjuk elő. Ezeket a szintetikus eljárásokat lényegében Itakura és munkatársai [Science, 198, 1056 (1977)] valamint Crea és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)] módszerével hajthatjuk végre. A szintetikus géneket és linkereket vagy Sysrec 1450 DNS szintetizátorral (Sysrec Inc., 3816 Chandler Drive, Minneapolis, MN), vagy ABS 380A

DNS szintetizátorral (Applied Biosystem, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) állíthatjuk elő. A szakterületen számos más DNS-szintetizáló berendezés ismert, és használható szintetikus DNS-fragmentek előállítására. Ennélfogva a jelen találmány semmiképpen nem korlátozódik a bemutatott DNS szekvenciákra és plazmidokra.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy a jelen találmány szerinti expressziós vektorokat eukarióta gazda-sejtek transzformálására használjuk, úgy, hogy a gazda-sejtek különböző könnyű- és nehéz-láncu struktúrákat expresszáljanak. Ha a gazdasejtet olyan vektorral transzformáljuk, amely a gazdasejtben működő promotert tartalmaz és ilyen immunoglobulin strukturgének transzkripcióját vezérli, valamint a gazdasejt rendelkezik a szignál-peptidek processzálásához szükséges sejt-mechanizmussal, akkor az ilyen sejtek érett antitesteket vagy antitest-láncokat szekretálnak. Más expressziós körülmények között, azaz ha a gazdasejtek csak immunoglobulin könnyű-láncot expresszálnak, akkor a könnyű láncokat a gazdasejtből kell izolálni.

Amint azt az előzőekben jeleztük, a jelen találmány szerinti vektorok, módszerek és antitestek jelentős hatással lesznek a rák ellen vivott küzdelemre.

A KS1/4 monoklonális antitestről kimutatták, hogy hatékony ágens az adenokarcinóma diagnosztizálásában, prognosztizálásában és kezelésében [Bumol, a Reisfeld, R.A. és Sell, S. szerk.: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. New York, Alan R. Liss, Inc., 257-259 (1985)]. Spearman és munkatársai [J. Pharmacol and Exp. Therapeutics, 241, 695-703 (1987)] munkájukban, amelyre az alábbiakban hivatkozni fogunk, leírták egy monoklonális antitest-vinca alkaloid konjugátum alkalmazását tumorok lokalizálásában és kezelésében. Ez a KS1/4-DAVLB (4-dezacetil-vinblasztin) konjugátum alkalmas volt tumor-növekedés gátlására [Bumol et al., a Ceriani, R.L. szerkesztette Immunological Approaches to the Diagnosis and Therapy of Breast Cancer New York and London: Plenum Press; 205-215 (1987)], amely eredményre a továbbiakban hivatkozni fogunk. Biokémiai és immunológiai kutatások kiderítették, hogy a jelen találmány szerinti rekombináns és kiméra KS1/4 molekulák ugyanolyan antigén reaktivitással rendelkeznek, mint a hibridóma sejtekből származó KS1/4 molekulák.

A rágcsáló antitestek használatából származó probléma azonban az, hogy ezek az antitestek gyakran immunválaszt váltanak ki emberekben. Ez előfordult né-

hány, KS1/4-es kezelést kapott betegnél. Ezt a problémát megoldhatjuk a jelen találmány szerinti kiméra antitestekkel. A KS1/4 konstans régióját humán eredetű konstans régióval helyettesítve a beteg immun-rendszere a kiméra antitest^{et}/sajátjaként ismeri fel, így kevesebb anti KS1/4 antitestet képez. A humán konstans régió alkalmazása továbbá segíti a komplement és egyéb-éjt válaszok aktiválódását.

A gyakorlott szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a KS1/4 eddig ismeretlen aminosav és DNS szekvenciája felhasználható új, erős vagy gyenge affinitással rendelkező származékok előállítására. Az antitest különböző részeit lehet kivágni vagy mutáltatni új antitestek előállítása céljából, vagy az egyik lánc egy részét másik láncból származó résszel lehet helyettesíteni. Röntgen-krisztallográfiás vizsgálatokkal lehet kimutatni, hogy az antitest melyik aminosavai vannak a KS1/4-hez kötődő antigén aminosavainak szoros közelében. Protein-engineering módszer felhasználásával a KS1/4 módosítható oly módon, hogy az antigén negatív- csoportjaival szemben pozitív maradékok legyenek. Az ilyen megváltoztatott ("engineered") antitestek módosított affinitást mutatnak a rák-betegekben lévő sejtfelszíni antigénekkel szemben.

A következő példák tovább illusztrálják a jelen szabadalmi leírást. A példák ismertetik a jelen találmány szerinti konstrukciók készítését, valamint ahol szükséges, ott az eljárások magyarázatát.

1. példa

A pKC283 plazmid izolálása

Az *E. coli* K12 BE1201/pKC283 törzs liofil ampullái NRRL-B15830 sorozám alatt hozzáférhetők a Northern Regional Research Laboratory-nál, Peoria, Illinois, 61604. A liofil ampullák tartalmát 10 ml LB táptalajt (10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract és 10 g NaCl per liter; a pH-t 7,5-re állítjuk) tartalmazó csövekbe visszük át, majd két órán át 32 °C-on inkubáljuk, majd a táptalajba ampicillint teszünk 50 µg/ml koncentrációban és 32 °C-on éjszakán át inkubáljuk. Az *E. coli* K12 BE1201/pKC283 sejteket 32 °C-on tenyésztjük, mivel a sejtek egy hőmérséklet-érzékeny cI represszort tartalmaznak a kromoszómális DNS-be integrálódva. Ha vad-típusu lambda pL represszor gént tartalmazó, vagy lambda pL promotert nem tartalmazó sejteket használunk ebben a plazmid-izolálási eljárásban, amint azt a következő példákban ismertetjük, akkor az inkubálás hőmérséklete 37 °C.

Az éjszakán át növesztett tenyészet kis részét olyan LB-agarra visszük (LB táptalaj, amely 15 g/l Bacto-agart tartalmaz), amely 50 µg/ml ampicillint

tartalmaz, oly módon, hogy az E.coli K12 BE1201/KC283-ból egyedi telepeket kapjunk. A kapott izolált telepet 10 ml LB + 50 µg/ml ampicillin összetételű táptalajba oltjuk, majd éjszakán át 32 °C-on inkubáljuk, erős rázatás közben. A 10 ml éjszakán át nőtt tenyészetet 500 ml LB + 50 µg/ml ampicillin tartalmu táptalajba oltjuk és 32 °C-on erős rázatás közben addig inkubáljuk, míg a tenyészet el nem éri a stationer fázist.

A következő eljárást adaptáltuk [Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)1].

A sejteket 4000 g, 10 perc, 4 °C paraméterekkel végzett centrifugálással elkülönítjük, majd a felüluszt elkülönítjük. Az elkülönített sejteket 100 ml jéghideg STE pufferral mossuk (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8; 1 mM EDTA). Mosás után a sejteket 10 ml 1 oldatban szuszpendáljuk (50 mM glükóz; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA), amely 5 mg/ml lizozimet tartalmaz és 10 percig állni hagyjuk szobahőmérsékleten. Husz ml 2-es oldatot (0,2 N NaOH és 1 % SDS) adunk a lizozimmel kezelt sejtekhez, majd az oldatot óvatosan megkeverjük. Az elegyet jégen hagyjuk állni 10 percig.

A lizált sejt-keverékhez 15 ml jéghideg 5 mólos kálium-acetátot adunk (pH 4,8), majd az oldatot óvatosan megkeverjük. Az oldatot jégen inkubáljuk 10 percig.

Az 5 mólos kálium-acetát oldatot úgy állítjuk elő, hogy 11,5 ml jégecetet adunk 28,5 ml vízhez és 60 ml 5 mólos kálium-acetáthoz; a kapott oldat káliumra nézve 3 mólos, acetátra nézve 5 mólos.

A sejt-lizátumot Beckman SW27 rotorban (vagy annak megfelelő rotorban) centrifugáljuk 20 000/perc fordulatszámmal 20 percig 4 °C-on. A kromoszómális DNS és a törmelék a cső aljára ül ki. Körülbelül 36 ml felüluszt kapunk, ehhez 0,6 térfogat izopropanolt adunk, összekeverjük a kapott oldatot, szobahőmérsékleten hagyjuk állni 15 percig. A plazmid DNS-t szobahőmérsékleten lecentrifugáljuk (12 000 g, 30 perc). A felüluszt elöntjük, majd a DNS csapadékot 70 %-os alkohollal mossuk szobahőmérsékleten. Az etanolos mosólét leöntjük, és a csapadékot vákuum exszikkátorban szárítjuk. A csapadékot ezután 8 ml TE pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) feloldjuk.

A DNS oldathoz 8 g CsCl-ot adunk. Körülbelül 0,8 ml 10 mg/ml koncentrációju etidium-bromid vi-
zes oldatot adunk a CsCl-DNS oldat minden 10 ml-éhez. Az oldat végső sűrűsége körülbelül 1,55 g/ml, az etidium-bromid koncentrációja körülbelül 600 µg/ml. Az oldatot Beckman Type 50 centrifuga-csőbe tesszük, a tetejét paraffin-olajjal feltöltjük, lezárjuk, majd 45 000/perc for-

dulatszámmal 20 °C-on 24 órán át centrifugáljuk. Centrifugálás után két DNS-csik látható normál fényben. A záró sapkát eltávolítva a csőről az alsó DNS-csikot eltávolítjuk ~~/~~ 21-es injekciós tűvel ellátott fecskendővel, amellyel átszurjuk a centrifuga-cső falát.

Az etidium-bromidot vízzel telített 1-butanolos extrakcióval távolítjuk el. A CsCl-t TE pufferrel szemben dializissel távolítjuk el. Pufferelt fenollal, majd kloroformmal végzett extrakció után a DNS-t kicsapjuk, 70 %-os etanollal mossuk, majd megszárítjuk. Körülbelül 1 mg pKC283 plazmidot kapunk, így majd 4 °C-on tároljuk TE pufferben körülbelül 1,ug/,ul koncentrációban. A pKC283 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, az 1. ábrán mutatjuk be.

2. példa

A pKC283PX plazmid előállítása

Az első példa szerint előállított pKC283 DNS-ből körülbelül 10,ul-t elkeverünk 20,ul 10 x tömény közepes só-erősségű restrikciós pufferrel (500 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH7,5; 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT); 20,ul 1 mg/ml koncentrációju BSA-val, 5,ul PvuII restrikciós enzimmel (~ 50 egység a Bethesda Research

Laboratories (BRL) meghatározása szerint, ahonnan az összes, alábbiakban használt restrikciós enzimet beszerítettük), majd 145 μ l vízzel, majd a kapott reakcióelegyet 37 $^{\circ}$ C-on két órán át inkubáljuk. Az ismertetett restrikciós enzim-reakciókat rutinszerűen fenolos, majd kloroformos extrakcióval állítjuk le, amelyet a DNS kicsapása követ, egy etanolos mosás, majd a DNS oldása TE pufferben. Az ismertetett PvuII emésztés után a PvuII-vel emésztett pKC283 DNS-t kicsapjuk, majd 5 μ l TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 600 pikoról (pM) XhoI linkert (5'-CCTCGAGG-3') viszünk kináz reakcióba 10 μ l 5 x tömény kináz puffert (300 mM Tris-HCl, pH 7,8; 50 mM MgCl₂ és 25 mM DTT), 5 μ l 5 mM ATP-t, 24 μ l vizet, 0,5 μ l T4 polinukleotid-kináz (a P-L Biochemicals meghatározása szerint körülbelül 2,5 egység), 5 μ l 1 mg/ml BSA-t és 5 μ l 10 mM spermidint tartalmazó elegyet 37 $^{\circ}$ C-on 30 percig inkubálva.

A kináz reakcióból kikerült körülbelül 12,5 μ l XhoI linkert hozzáadjuk 5 μ l PvuII-vel emésztett pKC 283 plazmid DNS-hez, majd 2,5 μ l 10 x tömény ligáz puffert (300 mM Tris-HCl, pH 7.6; 100 mM MgCl₂ és 50 mM DTT), 2,5 μ l 1 mg/ml koncentrációju BSA-t, 7 μ l 5 mM koncentrációju ATP-t, 2,5 μ l (a P-L Biochemicals meghatározása szerint körülbelül 2,5 egység) T4 DNS li-

gázt, 2,5 μ l 10 mM koncentrációju spermidint és 3 μ l vizet adunk a DNS-hez. A kapott ligáló elegyet éjszakán át 4 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk. A ligálási reakció után a reakció-elegy koncentrációját ugy változtatjuk, meg, hogy megfeleljen egy magas sótartalmu puffer összetételének (0,1 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH7.5; 10 mMg Cl₂ és 1 mM DTT). Körülbelül 10 μ l (100 egység) XhoI restrikciós enzimet adunk az elegyhez, majd a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk.

A reakciót leállítjuk az XhoI restrikciós enzimmel emésztett DNS-t kicsapjuk, feloldjuk, majd a leírtak szerint ligáljuk, azzal a különbséggel, hogy a ligáló elegyhez nem adunk XhoI linkert. A ligált DNS a kívánt pKC283 PX plazmid. A pKC283 PX plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán mutatjuk be.

3. példa

Az E.coli K12 MO (λ^{+})/pKC283PX

előállítása

Az E.coli K12 MO(λ^{+}) törzset NRRLB-15993 sorszám alatt lehet beszerezni a Northern Regional Research Laboratories-tól liofilizált formában. Az E.coli K12 MO(λ^{+}) törzs tartalmazza a vad-tipusu λ pl CI represszor gént, így a jelen találmány szerinti

pL-lpp hibrid promoterről nincs transzkripció *E. coli* K12 MO (λ^+) sejtekben. A liofil ampullákat fel-
élesztjük, MO(λ^+) egyedi telepeket izolálunk, majd
az 1. példa szerint MO(λ^+) sejtek 10 ml éjszakán
át nőtt tenyészetét állítjuk elő, azzal a különbséggel,
hogy az inkubálás hőmérséklete 37°C , és a növesztő
táptalajban nem használunk ampicillint.

Az éjszakán át növesztett tenyészetből
50 μl -t használunk 5 ml LB táptalaj beoltására, amely
10 mM MgSO_4 -et és 10 mM MgCl_2 -t is tartalmaz. A tenyész-
tet éjszakán át 37°C -on inkubáljuk erős rázatás köz-
ben. Másnap reggel a tenyészetet 10 mM MgSO_4 -et és 10 mM
 MgCl_2 -t tartalmazó 200 ml LB táptalajjal meghigítjuk.
A hígított tenyészetet 37°C -on erős rázatás közben inku-
báljuk, amíg az 550 nm-en mért elnyelés (A_{550}) körül-
belül 0,5 lesz, amely körülbelül 1×10^8 sejt/ml sejt-
sűrűséget jelent. A tenyészetet tíz percig jeges víz-
fürdőben hűtjük, majd a sejteket lecentrifugáljuk 4000 g,
10 percig 4°C -on. A sejt-üledéket 100 ml hideg 10 mM-os
 MgSO_4 -ben szuszpendáljuk, majd újra kiülepítjük centri-
fugálással. A sejt-üledéket újra szuszpendáljuk 100 ml
30 mM-os CaCl_2 -ben, és 20 percig jégen inkubáljuk.

A sejteket újra összegyűjtjük centri-
fugálással, majd 10 ml 30 mM-os CaCl_2 -ban reszuszen-

dáljuk. A sejt-szuszpenzióból fél milliliteres alikvot részt adunk a 2. példában előállított DNS-hez; a DNS-t 30 mM CaCl_2 -ban oldjuk fel. A sejt-DNS keveréket jégfürdőben inkubáljuk egy órán át, hővel sokkoljuk 42°C -on 90 másodpercig, majd jégbehűtjük körülbelül két percig. A sejt-DNS keveréket 10 ml LB táptalajban higitjuk 125 ml-es lombikban, majd egy órán át 37°C -on inkubáljuk. Száz mikroliteres alikvot részeket szélesztünk ampicillint tartalmazó LB agarlemezeken, majd 37°C -on inkubáljuk a telepek megjelenéséig.

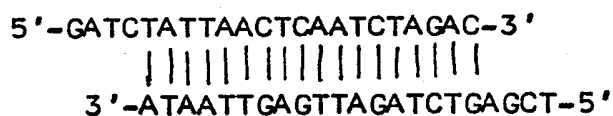
A telepeket elkülönítve tenyésztjük, majd az egyes telepekből nyert plazmid DNS-t restrikciós enzim analízissel és gélelektroforézissel vizsgáljuk. A plazmid DNS izolálását az 1. példa szerinti eljárással végezzük, de kisebb méretben, a CsCl lépést kihagyva, amíg a kívánt *E. coli* K12M0(λ^+) pKC283PX transzformánsokat azonosítjuk. A pKC283PX plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán közöljük.

4. példa

Az *E. coli* K12M0(λ ⁺) pKC283-L előállítása

10 μ g, az 1. példa szerint előállított pKC 283PX plazmid DNS-t oldunk 20 μ l 10-szer tömény magas sótartalmu pufferben, majd 20 μ l 1 mg/ml BSA-t, 5 μ l ($\approx$ 50 egység) BglII restrikciós enzimet, 5 μ l ($\approx$ 50 egység) XhoI restrikciós enzimet és 150 μ l vizet adunk hozzá és a kapott reakció-elegyet két órán át inkubáljuk 37 °C-on. A reakciót leállítjuk és a BglII-XhoI restrikciós enzimekkel emésztett DNS kicsapása után a DNS-t 5 μ l TE pufferben oldjuk.

BglII és XhoI restrikciós enzimeknek megfelelő egyszálu végekkel rendelkező DNS linkert szintetizálunk és foszforilezzük a végét. A foszforilezést a 2. példában leírt eljárás szerint végezzük. A DNS linker szerkezete a következő:



A fenti linkert egyszálu deoxioligonukleotidokból állítjuk elő a szakterületen ismert módon. Az egyszálu dezoxi-oligonukleotidokat kereskedelmi forgalomban lévő készülékekkel állíthatjuk elő, például az Applied Biosystems (850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA94404)

által forgalomba hozott 380A DNS-szintetizátorral, amely foszforamidit kémiát alkalmaz. A szakterület más DNS-szintézis módszerek is ismertek. Az egyszerű DNS előállításának szokásos módosított foszfortriészter módszerét Itakura és munkatársai írják le (Science, 198, 1056 (1966)) valamint Crea és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)]. Emellett a DNS szintézisnek egy különösen előnyös módszerét is leírják [Hsiung et al., Nucleic Acids Research, 11, 3227 (1983) valamint Narauug et al., Methods in Enzymology, 68, 90 (1980)].

A linkert, valamint a BglII-XhoI restrikciós enzimekkel emésztett plazmidot a 2. példában leírt eljárással ligáljuk. A ligált DNS a kívánt pKC283-L plazmid. A pKC283-L plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán mutatjuk be. A pKC283-L DNS-t használjuk az E.coli K12MO (λ^+) törzst transzformálására, és a kapott E.coli K12 MO(λ^+)/pKC283-L transzformánsokat lényegében a 3. példában leírt módszerrel azonosítjuk.

5. példaAz E.coli K12 MO(λ ⁺) pKC283-LB törzs
előállítása

Körülbelül 10 μ g, az 1. példában leírt eljárással előállított pKC283-L plazmid DNS-t oldunk 20 μ l 10 x tömény magas sótartalmu pufferben, majd 20 μ l 1 mg/ml BSA-t, 5 μ l ($\sim$ 50 egység) XhoI restrikciós enzimet és 155 μ l vizet adunk hozzá, és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az XhoI-gyel emésztett pKC283-L plazmid DNS-t ezután kicsapjuk a reakció-elegyből 3 térfogat 95 %-os etanol és egytized térfogat 3 mólos nátrium-acetát hozzáadásával, 5 percig szárazjég-etanol fürdőben inkubálva az elegyet, majd lecentrifugáljuk. A kapott DNS-csapadékot 70 %-os etanollal mossuk, szárítjuk, majd 2 μ l 10 x tömény nick-transzlációs pufferben oldjuk (0,5 M Tris-HCl, pH 7.2; 0,1 M MgSO₄ 1 mM DTT), majd mindegyik dezoxinukleotid trifoszfátból 1 μ l 2mM-os oldatot adunk hozzá, majd 15 μ l vizet, 1 μ l (a P-L Biochemicals meghatározása szerint $\sim$ 6 egység) Klenow fragmentet, amely az E.coli DNS polimeráz I nagy fragmentje, és végül 1 μ l 1 mg/ml koncentrációju BSA-t. A kapott reakció-elegyet 30 percig inkubáljuk 25 °C-on, a reakciót az oldat 5 percig 70 °C-on tartásával állítjuk le.

BamHI linkereket (4'-CGGGATCCCG-3') foszforilezünk és ligálunk XhoI restrikciós enzimmel emésztett, Klenow fragmenttel kezelt pKC283-L DNS-hez, a 2. példában leírt eljárás szerint. A ligálási reakció után a DNS-t körülbelül 100 egység BamHI enzimmel emésztjük 2 órán át 37 °C-on magas sótartalmu pufferben. A BamHI-es emésztés után a DNS-t ligáláshoz készítjük elő, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint.

A 5,9 kb méretű BamHI restrikciós fragmentet ligálással cirkularizáljuk majd E.coli K12MO(λ^+) törzsebe transzformáljuk, lényegében a 2. és 3. példákban leírt eljárások szerint. Az E.coli K12MO (λ^+)/pKC283-LB transzformánsokat azonosítjuk, majd a pKC283-LB plazmid DNS-t az 1. példában leírt eljárás szerint izoláljuk. A pKC283-LB plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között, az 1. ábrán mutatjuk be.

6. példa

Az E.coli K12MO(λ^+) pL32 törzs előállítása

Körülbelül 10 μ g pKC283 PX plazmid DNS-t emésztünk SalI restrikciós enzimmel magas sótartalmu pufferben, Klenow fragmenttel kezeljük, majd EcoRI linkerekhez (5'-GAGGAATTCCTC-3') ligáljuk, lényegében az 5. példa szerinti eljárást alkalmazva, azzal a különbséggel, hogy a kiindulási plazmid, a restrikciós enzimek és linkerek mások.

EcoRI restrikciós enzimmel való emésztés után, amelynek eredményeképpen egy $\sim 2,1$ méretű DNS-t eltávolítunk, a $\sim 4,0$ kb méretű EcoRI restrikciós fragmentet ligálással recirkularizáljuk, így kapjuk a pKC283PRS plazmidot. A ligált DNS-sel transzformálunk E.coli K12 MO(λ +) sejteket, lényegében a 3. példában leírt eljárást alkalmazva. Az E.coli K12MO(λ +)/pKC283PRS transzformások azonosítása után a pKC283PRS plazmid DNS-t izoláljuk az 1. példában leírt eljárás szerint. A pKC283PRS plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán közöljük.

Körülbelül $10 \mu\text{g}$ pKC283PRS plazmidot emésztünk $200 \mu\text{l}$ magas sótartalmu pufferben körülbelül 50-50 egység PstI és SphI restrikciós enzimmel. A reakció-elegyet körülbelül 2 órán át 37°C -on inkubáljuk, majd 0,6 %-os alacsony olvadáspontu agarózon (FMC Corporation, Marine Colloids Division, Rockland, Maine 04841) elektroforetizáljuk 2-3 órán át ~ 130 V és ~ 75 mA mellett Tris-acetát pufferben.

A gél tég etidium-bromid oldattal festjük, és a $\sim 0,85$ kb méretű PstI-SphI restrikciós fragmentet tartalmazó DNS csíkot, amelyet hosszuhullámú UV-fénnyel teszünk láthatóvá, kivágjuk a gélből egy kis géldarabban.

A géldarab térfogatát sulya és sűrűsége alapján meghatározzuk, majd azonos térfogatú Tris-HCl, pH7.6 puffer adunk a géldarabot tartalmazó csőhöz. A géldarabot ezután 72 °C-ra melegítve megolvasztjuk. A pKC283PRS plazmid $\sim 0,85$ kb méretű restrikciós fragmentjéből körülbelül 1 μ g-ot kapunk körülbelül 100 μ l térfogatban. Hasonló módon a pKC283-LB plazmidot PstI és PshI restrikciós enzimekkel emésztjük, és a kapott $\sim 3,0$ kb méretű restrikciós fragmentet agaróz gélelektroforézissel izoláljuk és ligáláshoz előkészítjük.

A pKC283PRS plazmid $\sim 0,85$ kb méretű PstI-SphI restrikciós fragmentjét a pKC283-LB plazmid $\sim 3,0$ kb méretű restrikciós fragmentjéhez ligáljuk, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint. Az összeligált DNS molekula a kívánt pL32 plazmid. A pL32 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán mutatjuk be. A pL32 plazmidot E.coli K12MO(λ^+) sejtekbe transzformáljuk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. Az E.coli K12MO(λ^+)/pL32 transzformánsokból izoláljuk a pL32 plazmid DNS-t, lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint. A pL32 plazmid DNS-ének elemzése kimutatta, hogy több mint egy EcoRI linker kapcsolódott a pKC283PY plazmid Klenow fragmenttel kezelt

SalI végeihez. Egy vagy több EcoRI linker jelenléte nem érinti a pL32 plazmid vagy a pL32 plazmid származékainak használhatóságát, és egy XhoI restrikciós hely meglétével igazolható, amely akkor keletkezik, amikor két EcoRI linkert ligálunk egymáshoz. Más módszer szerint a pL32 plazmidot úgy állíthatjuk elő, hogy SalI-EcoRI emésztést és ligálást végzünk a pKC283-LB plazmidon ennek a példának az első pontja szerint.

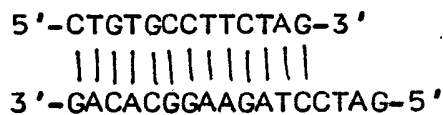
7. példa

Az *E.coli* K12MO(λ ⁺)/pL47 törzs előállítása

Az *E.coli* K12RV308/pNM789 törzs NRRL B-18216 sorszám alatt hozzáférhető liofilezett formában a Northern Regional Research Laboratories-nál. A pNM789 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 2. ábrán közöljük. A plazmid DNS-t az 1. példában leírt eljárás szerint kivonjuk a tenyészetből, azzal a különbséggel, hogy a tenyésztés hőmérséklete nem 32 °C, hanem 37 °C. Tíz mikrogramm pNM789 plazmid DNS-t oldunk 200 μ l PvuII pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM NaCl és 6 mM MgCl₂). Egy egység PvuII restrikciós enzimet adunk hozzá, és a reakció-elegyet 5 percig 37 °C-on inkubáljuk. Az enzimet 10 perces 65 °C-on tartással inaktiváljuk. 30 μ l 10x tömény BamHI puffert (200 mM Tris-

-HCl (pH8.0), 1M NaCl és 70 mM MgCl₂), 70 µl vizet és 10 egység BamHI restriktációs enzimet adunk hozzá és a reakció-elegyet 1 órán át 37 °C-on tartjuk. Ezt követi 5 egység alkalikus foszfatáz hozzáadása, majd egy 1 órás 65 °C-os inkubálás. A DNS fragmenteket 1 %-os agaróz gélen választjuk el, és az egyszerűen hasított DNS fragmentet tisztítjuk.

Tompa véggel és BamHI véggel rendelkező DNS linkert szintetizálunk lényegében a 4. példában leírtak szerint. Ennek a linkernek a szerkezete (lásd 3. ábra) a következő:



A linkert foszforilezzük és a BamHI-PvuII enzimekkel emésztett pNM789 plazmidba ligáljuk, lényegében a 2. példában leírtak szerint. Ezt a ligáló elegyet használjuk E.coli K12RV308 sejtek transzformálására, majd a 3. példában leírt módon plazmidot izolálunk, a transzformánsokból. Azokat a plazmidokat választjuk ki, amelyek a megfelelő méretű PvuII fragmentet (494 bp) és XbaI-BamHI fragmentet (628 bp) tartalmazzák. Ezek közül legalább kettőnek a nukleotid szekvenciáját meghatározzuk a BamHI és SmaI hasítási helyek között, és egy a kívánt szekvenciával rendelkező klónt kiválasztunk. Ezt az átmeneti plazmidot je-

löljük 120 plazmid elnevezéssel. A fenti eljárás sémáját, valamint a 120 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 3. ábrán mutatjuk be.

Az EK-BGH-t kódoló DNS izolálásához körülbelül 10 µg 120 plazmidot emésztünk 200 µl magas sótartalmu pufferben, körülbelül 50-50 egység XbaI és BamHI restrikciós enzimmel. Az emésztési termékeket agaróz gélelektroforézissel választjuk szét, és az EK-BGH-t kódoló ~ 0,6 kb méretű XbaI-BamHI restrikciós fragmentet izoláljuk és ligáláshoz előkészítjük, lényegében a 6. példában leírt eljárás szerint.

A pL32 plazmidot is emésztjük XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel, a ~ 3,9 kb méretű restrikciós fragmentet izoláljuk és előkészítjük ligáláshoz. A pL32 plazmid ~ 3,9 kb méretű XbaI-BamHI restrikciós fragmentjét a 120 plazmid ~ 0,6 kb méretű XbaI-BamHI restrikciós fragmentjéhez ligáljuk lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint, így kapjuk a pL47 plazmidot. A pL47 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 4. ábrán közöljük. A pL47 plazmidot E.coli K12MO(λ^+) törzsbe transzformáljuk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint, és az E.coli K12MO(λ^+)/pL47 transzformánsokat azonosítjuk. A pL47 plazmid DNS-t izoláljuk a transzformánsokból, lényegében az 1. példában közölt leírás szerint.

8. példa

A pPR 12 plazmid tartalmazza a cI857 hő-mérséklet-érzékeny pL represszor gént, valamint a pBR322 tetraciklin rezisztenciát kódoló génjét. A pPR12 plazmidot az 1984 március 13-án közzétett 4 436 815 sor-számu Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás-ban közlik. A pPR12 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 4. ábrán közöljük.

Körülbelül 10 µg pPR12 plazmid DNS-t emésztünk körülbelül 50 egység EcoRI restrikciós enzimmel 200 µl magas sótartalmu pufferben 37 °C-on két órán át. Az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett pPR12 plazmid DNS-t ki-csapjuk és Klenow fragmenttel kezeljük lényegében az 5. példában leírt eljárás szerint. A Klenow reakció után az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett, Klenow fragmenttel kezelt pPR12 plazmid DNS-t ligálással recirkularizáljuk, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint. A ligált DNS molekulát, amely a kívánt pPR12△R1 plazmid, használ-juk E.coli K12RV308 törzstranzformálására, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint, azzal a különbséggel, hogy a szelekció tetraciklin rezisztencián alapul (5 µg/ml) és nem ampicillin rezisztencián. Az E.coli K12RV308 törzs NRRL B-15624 sorszám alatt elérhető az NRRL-nél. Az E.coli K12RV308/pPR12△R1 transzformánsok azonosítása után a transzformánsokból pPR12△R1 plazmid DNS-t izolálunk

lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint.

Körülbelül 10 µg pPR12 Δ R1 plazmid DNS-t emésztünk körülbelül 50 egység AvaI restrikciós enzimmal 200 µl közepes sókoncentrációju pufferben 2 órán át 37 °C-on. Az AvaI restrikciós enzimmal emésztett pPR12 Δ R1 plazmid DNS-t kicsapjuk, majd Klenow fragmenttel kezeljük, lényegében az 5. példában közölt eljárás szerint. A Klenow reakció után az AvaI restrikciós enzimmal emésztett, Klenow fragmenttel kezelt pPR12 Δ R1 plazmid DNS-t EcoRI linkerrekhez ligáljuk (5'-GAGGAATTCCTC-3'), lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint. A linker ligálása után a DNS-t kicsapjuk, majd körülbelül 50 egység EcoRI restrikciós enzimet tartalmazó 200 µl magas sótartalmu pufferben oldjuk. A kapott reakció-elegyet 37 °C-on körülbelül 2 órán át inkubáljuk. Az EcoRI-es emésztés után a reakció-elegyet agaróz-gélre visszük, majd a ~5,1 kb méretű EcoRI restrikciós fragmentet lényegében a 6. példában leírt eljárással tisztítjuk. A ~5,1 kb méretű EcoRI restrikciós fragmentet ligálással recirkularizáljuk, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint. A ligált DNS molekula a kívánt pPR12AR1 plazmid. A pPR12AR1 plazmid DNS-t E.coli K12RV308 törzsbe transzformáljuk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint, azzal a különbséggel, hogy a szelekció alapja nem az ampicillin rezisztencia, hanem a tetra-

ciklin rezisztencia. Az *E.coli* K12RV308/pPR12AR1 transzformánsok azonosítása után a pPR1/AR1 plazmid DNS-t izoláljuk, lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint. A pPR12AR1 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 4. ábrán mutatjuk be.

9. példa

Az *E.coli* K12RV308/pL110 törzs előállítása

Körülbelül 10 µg pPR12AR1 plazmid DNS-t szuszpendálunk körülbelül 50-50 egység PstI és EcoRI restrikciós enzimet tartalmazó körülbelül 200 µl magas sótartalmu pufferben, majd a reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk körülbelül 2 órán át. A reakció elegyet ezután agaróz gélre visszük, majd a pPR12AR1 plazmid ~ 2,9 kb méretű restrikciós fragmentjét izoláljuk, majd ligáláshoz készítjük elő, lényegében a 6. példában leírt eljárás szerint.

Körülbelül 10 µg pL47 plazmidot emésztünk PstI és BamHI restrikciós enzimekkel 200 µl magas sótartalmu pufferben 37 °C-on két órán át. A PstI-BamHI restrikciós enzimekkel emésztett DNS-t agaróz gélre visszük, és a ~ 2,7 kb méretű PstI-BamHI restrikciós fragmentet, amely a replikációs origót és az ampicillin rezisztencia gén egy részét tartalmazza, izoláljuk és ligáláshoz előkészítjük, lényegében a 6. példában leírt eljárás szerint. Egy külön reakcióban körülbelül 10 µg pL47 plazmid DNS-t emész-

tünk EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel 200 μ l magas sótartalmu pufferben, és a $\sim 1,03$ kb méretű EcoRI-BamHI restrikciós fragmentet izoláljuk, amely tartalmazza az új transzkripciós és transzlációs aktiváló szekvenciákat, valamint az EK-BGH-t kódoló DNS-t, majd ligáláshoz készítjük elő, lényegében a 6. példában leírt eljárás szerint. A $\sim 1,03$ kb méretű EcoRI-BamHI restrikciós fragmentből ~ 2 μ g-ot kapunk, és ezt használjuk a pL110 plazmid előállításában.

A pL47 plazmid $\sim 2,7$ kb méretű PstI-BamHI fragmentjét, valamint $\sim 1,03$ kb méretű EcoRI-BamHI restrikciós fragmentjét a pPR12AR1 plazmid $\sim 2,9$ kb méretű PstI-EcoRI fragmentjéhez ligáljuk, így kapjuk a pL110 plazmidot, majd a ligált DNS-sel E.coli K12RV308 törzset transzformálunk, lényegében a 2. és 3. példákban leírt eljárások szerint, azzal a különbséggel, hogy a transzformánsok, szelektálására nem ampicillin rezisztenciát használunk, hanem tetraciklin rezisztenciát.

Két PstI restrikciós enzim felismerési hely található az EK-BGH kódoló régióban, amelyet nem ábrázolunk a kísérő rajzok között bemutatott restrikciós és funkcionális térképeken. A pL110 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 4. ábrán mutatjuk be.

10. példa

A BK virus DNS előállítása

A BK virus ATCC Vr-837 sorszám alatt hozzáférhető az American Type Culture Collectionnál. A virust fagyasztva - szárított formában szállítják és Hank féle kiegyensúlyozott sóoldatban (Gibco, B175 Stalley Road, Grand Island, NY 14072) szuszpendáljuk, így körülbelül 10^5 plakk-képző egység (pfu)/ml titert kapunk. A BK virus DNS előállításához választott gazdaszervezet a primer humán embionális vese-sejt (PHEK), amely beszerezhető a Flow Laboratories Inc.-től (7655 Old Springhouse Road, McLean, VA22101) O-100 katalógusszám alatt, vagy az M.A. Bioproducts-tól a 70-151 katalógusszám alatt.

Körülbelül 5 db 75 mm^2 felületű polisztirol lombikot, amely körülbelül 10^6 PHEK sejt által képzett egybefüggő egysejtréteget tartalmaz, használunk a vírus előállítására. Mindegyik lombikhoz körülbelül 1 ml, 10^5 pfu/ml titerű BK virus szuszpenziót adunk, majd egy órán át 37°C -on inkubáljuk őket, ezután friss tenyésztő táptalajt (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco, 10 % borjúmagzat szérummal kiegészítve) adunk hozzá és a fertőzött sejteket 10-14 napig 37°C -on inkubáljuk, mindaddig amíg a vírus teljes citopatogén hatása meg nem nyilvánul. Ez a citopatogén hatás sejtvonalról sejtvonalra

változik, valamint a virustól is függ, de rendszerint úgy nyilvánul meg, hogy a sejtek kikerekednek, össze-
csapzódnak és kiülnek a tenyésztő-edényből.

A virust a sejtekből három lefagyasztási-fel-
olvasztási ciklussal lehet kiszabadítani, a sejttörmelé-
ket 5000 g-vel végzett centrifugálással távolítjuk el.
Az 1 liter felüluszó folyadékban levő virust kicsapjuk
és 100 g PEG-6000 hozzáadásával az oldat 4 °C-on vég-
zett 24 órás inkubálásával összegyűjtjük, majd 20 percig
5000 g-vel centrifugálva összegyűjtjük. A csapadékot az
eredeti térfogat egy századrészét kitevő 0,1 x SSC puf-
ferben oldjuk (1 x SSC = 0,15 M NaCl és 0,015 M Na-cit-
rát, pH=7). A vírus-szuszpenziót 15 ml telített KBr-ol-
datra rétegezzük, majd 3 órán át 75 000 g-vel centrifu-
gáljuk. Centrifugálás után két csíkot látunk a KBr ol-
datban. Az alsó csíkot, amely a komplett viriont tartal-
mazza, összegyűjtjük, és Sephadex G-50 oszlopon sómen-
tesítjük (Sigma Chemical Co., P.O.Box 14508, St. Louis,
MO 63178) TE-t (10 mM Tris-HCl, pH = 7.8 és 1 mM EDTA)
használva eluáló pufferként.

Az oszlopról lejtött, tisztított virionokat
tartalmazó oldathoz nátrium-dodecil-szulfátot adunk,
1% koncentrációban; ezután pronázt adunk hozzá 100 µg/ml
koncentrációban és az oldatot 2 órán át 37 °C-on inku-

báljuk. Az oldathoz ezután cézium-kloridot adunk 1.56 g/ml sűrűség eléréséig, majd etidium-bromidot 100 µg/ml végkoncentrációban. Az oldatot Sorvall (DuPont Inst. Products, Biomedical Division, Newton, CT 06470) 865 rotorban, vagy hasonló vertikális rotorban centrifugáljuk 24 órán át 260 000 g-vel. Centrifugálás után a vírus DNS csikját izoláljuk, majd ötször extraháljuk 100 mM Tris-HCl (pH7.8) oldattal telített izoamil-alkohollal. A BK vírus DNS oldatát ezután TE pufferrel szemben dializáljuk, mindaddig, míg a DNS oldat 260 nm/280 nm abszorpciójának aránya 1,75 és 1,90 közé nem kerül. A DNS-t kicsapjuk a NaCl koncentrációt 0,15 M-ra állítva, két térfogat etanolt hozzáadva az oldathoz, majd az oldatot -70 °C-on tartjuk legalább két órán át és 12.000 g-vel 10 percig centrifugáljuk. A kapott BK vírus DNS csapadékot TE pufferben oldjuk 1 mg/ml koncentrációban. A BK vírus restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 5. ábrán közöljük.

11. példa

A pBKneo1 és pBKneo2 plazmidok előállítása

Az E.coli K12 HB101/pdBPV-MMTneo törzs ATCC 37224 sorszám alatt hozzáférhető liofilezett formában az American Type Culture Collection-től. A liofilezett sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó L-agarlemezekre szélesztjük és 37 °C-onaddig inkubáljuk, amíg izolált

telepek nem nőnek ki.

Egy liter 50 μ g/ml ampicillint tartalmazó L táptalajba (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g yeast extract literenként) oltunk egy E.coli K12HB101/pdBPV-MMTneo telepet és levegőztetés közben addig rázatjuk, amíg a tenyészet OD₅₉₀ értéke ≈ 1 lesz, ekkor 150 mg kloramfenikolt adunk a tenyészetéhez. Az inkubálást újabb 16 órán át folytatjuk; a kloramfenikol hozzáadása gátolja a fehérje-szintézist és így gátolja a további sejtosztódást, de hagyja, hogy a plazmid-replikáció tovább folytatódjon.

Ebből a tenyészetből izoláljuk a plazmid DNS-t lényegében az 1. példában leírtak szerint és a kapott ≈ 1 mg pdBPV-MMTneo plazmid DNS-t 1 ml TEpufferben izoláljuk és -20 °C-on tároljuk.

Körülbelül 5 μ g (5 μ l), a fentiek szerint előállított pdBPV-MMTneo plazmid DNS-t és körülbelül 5 μ g (5 μ l) a 10. példában előállított BK vírus DNS-t emésztünk 37 °C-on 2 órán a következő összetételű oldatban: 2 μ l 10 x tömény BamHI puffer (1,5 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH = 7.9; 60 mM MgCl₂ és 1 mg/ml BSA), 1 μ l BamHI restrikciós enzim és 7 μ l viz. A reakciót azonos térfogatu fenollal végzett extrakcióval állítjuk le, majd ezt követi két kloroformos extrakció. Ezután mindkét

BamHI restrikciós enzimmel emésztett DNS-t kicsapjuk, centrifugálással összegyűjtjük, majd 5,ul vízben oldjuk.

Körülbelül 1,ul 10 x tömény ligáz puffert adunk 1,ul BamHI restrikciós enzimmel emésztett pdBPV-MMTneo plazmid és 1,ul BamHI restrikciós enzimmel emésztett BK vírus DNS-hez. Ezután 1,ul (~ 1000 egység) T4 DNS ligázt és 6,ul vizet adunk a DNS keverékhez, és a reakciót éjszakán át 16°C -on inkubáljuk. Az összeligált DNS molekulák a kívánt pBKneo1 és pBKneo2 plazmidok, amelyek csak a BK vírus-DNS orientációjában különböznek egymástól. A pBKneo1 plazmid egy $\sim 2,1$ kb méretű SalI-HindIII restrikciós fragmentet tartalmaz.

Az *E. coli* K12HB101 törzs NRRL B-15626 sorszám alatt hozzáférhető liofilezett formában, a Northern Regional Research Laboratory-nál. Az *E. coli* K12HB101 sejtek tenyésztését, transzformációhoz kompetenssé tételét, valamint a fentiek szerint ligált DNS-sel való transzformációját lényegében a 3. példában leírtak szerint végezzük. A transzformált sejteket $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicillint tartalmazó L-agarlemezre szélesztjük. Az *E. coli* K12HB101/pBKneo1 és *E. coli* K12/pBKneo2 transzformánsokat ampicillin rezisztens fenotípusuk és plazmid DNS-ük restrikciós analízise alapján azonosítjuk. A pBKneo1

plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között az 5. ábrán mutatjuk be.

12. példa

A pBLcat plazmid előállítása

A. A pLPcat intermediér plazmid előállítása

Az adenovirus 2 (Ad2) viri_on DNS egy körülbelül 35,94 kb méretű kétszálu lineáris molekula. Az Ad2 késői promotert az Ad2 genom egy $\sim 0,316$ kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragmentje formájában izolálhatjuk; ez a $\sim 0,32$ kb méretű restrikciós fragment megfelel az Ad2 genom 5755 és 6701 sorszámú nukleotidja közötti szekvenciának. A kívánt $\sim 0,32$ kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragment izolálása céljából az Ad2DNS-t először BalI restrikciós enzimmel emésztjük és a $\sim 0,32$ kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragment teljes szekvenciáját tartalmazó $\sim 2,4$ kb méretű BalI restrikciós fragmentet izoláljuk. Ezután a $\sim 2,4$ kb méretű BalI restrikciós fragmentet AccI és PvuII restrikciós enzimekkel emésztjük, hogy a kívánt fragmentet megkapjuk.

Körülbelül 50 μ g Ad2 virus DNS-t (hozzáférhető a BRL-nél vagy az ATCC-nél VR-2 sorszám alatt) oldunk 80 μ l vízben és 10 μ l 10x tömény BalI pufferben (100 mM Tris-HCl, pH = 7.6; 120 mM MgCl₂; 100 mM DTT és 1 mg/ml BSA).

Körülbelül 10 μ l ($\approx$ 20 egység) BalI-restrikciós enzimmet adunk az Ad2 DNS- oldatához és a kapott reakcióelegyet 4 órán át 37 °C-on inkubáljuk.

A BalI restrikciós enzimmal emésztett DNS-t agaróz géltre visszük és addig elektroforetizáljuk, míg a restrikciós fragmentek jól szét nem válnak. Az elektroforetizált DNS-t úgy tesszük láthatóvá, hogy a gélt hig (0,5 μ g/ml) etidium-bromid oldattal festjük, és a festett gélt hosszú-hullámu ultraibolya fénnnyel világítjuk meg. A DNS izolálására alkalmas egyik módszer a következő. Egy kis vágást ejtünk a gélben a kívánt fragment előtt, és egy kis darab NA-45DEAE membránt (Schleicher and Schnell, Keene, NH 03431) helyezünk mindegyik vágásba. A további elektroforézis során a DNS nem-kovalens módon kötődik a DEAE membránhoz. Miután a kívánt fragment hozzákötődött a DEAE membránhoz, a membránt eltávolítjuk és alacsony sótartalmu pufferrel öblítjük (100 mM KCl; 0,1 mM EDTA és 20 mM Tris-HCl, pH = 8). A membránt ezután egy kis kémcsőbe helyezzük és magas sótartalmu pufferba meritjük (1 M NaCl; 0,1 mM EDTA és 20 mM Tris-HCl, pH = 8), majd egy órán át 65 °C-on inkubáljuk, hogy a DNS-t eltávolítsuk a DEAE papírról. A 65 °C-os inkubálás után az inkubáló puffert összegyűjtjük és a membránt magas só-tartalmu pufferral öblítjük. A magas só-

tartalmu inkubáló pufferrel.

A magas sótartalmu DNS oldat térfogatát úgy változtatjuk meg, hogy a NaCl koncentráció 0,25 M legyen, majd az oldathoz három térfogat hideg, abszolút etanolt adunk. A kapott oldatot összekeverjük és 10-20 percre -70°C -ra helyezzük. Az oldatot ezután 15 percig 15 000/perc fordulatszámmal centrifugáljuk. A maradék só eltávolítása céljából másodszor is kicsapjuk a DNS-t, majd a csapadékot etanollal mossuk, szárítjuk és 20 μl TE pufferben oldjuk. Így körülbelül 3 μg -ot a kívánt Ad2 restrikciós fragmentből. A kapott tisztított fragmentet 10 μl TE pufferben oldjuk.

Az Ad2 $\sim 2,4$ kb méretű BalI restrikciós fragmentjéhez körülbelül 6 μl vizet és 2 μl 10x AccI puffert adunk (60 mM NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 60 mM MgCl_2 ; 60 mM DTT és 1 mg/ml BSA). Miután a reakcióelegyhez körülbelül 2 μl (~ 10 egység) AccI restrikciós enzimet adtunk, 2 órán át 37°C -on inkubáljuk az elegyet. Az AccI restrikciós enzimmel végzett emésztés után a DNS-t etanolos kicsapással összegyűjtjük majd 16 μl vízben és 2 μl 10x tömény PvuII pufferben (600 mM NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH= 7,5, 60 mM MgCl_2 ; 60 mM DTT és 1 mg/ml BSA) oldjuk. Körülbelül 2 μl (körülbelül 10 egység)

PvuII restrikciós enzimmel a DNS oldathoz adása után a reakció-elegyet 37 °C-on két órán át inkubáljuk.

Az Ad2 AccI-PvuII restrikciós enzimmel emésztett ~2,4 kb méretű BalI restrikciós fragmentjét egy ~6 % -os poliakrilamid gélre visszük és addig elektroforetizáljuk, míg a ~0,32 kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragment, amely az Ad2 késői promotert tartalmazza, el nem válik a többi emésztési terméktől. A gélét etidium-bromiddal festjük és UV fénnnyel megvilágítjuk és a ~0,32 kb méretű PvuII-AccI restrikciós fragmentet tartalmazó gél darabot kivágjuk a gélből, összetörjük, majd szobahőmérsékleten 250 µl extrakciós pufferben áztatjuk (500 mM NH₄OAc; 10 mM MgOAc; 1 mM EDTA és 0,1 % SDS). A következő reggelen a keveréket lecentrifugáljuk és az üledéket eldobjuk. A felüluszóban lévő DNS-t etanollal kicsapjuk; körülbelül 2 µg tRNS-t adunk hozzá, hogy teljessé tegyük a kívánt fragment kicsapását. Körülbelül 0,2 µg-ot kapunk a ~0,32 kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragmentből, ezt 7 µl vízben oldjuk.

Körülbelül 0,25 µg (0,5 µl-ben) BclI linkert (5'-CTGATCAG-3', New England Biolabs termék) foszforilezünk lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint és a ~0,32 kb méretű AccI-PvuII restrikciós fragment

oldatához adjuk, majd 1,ul (~1000egység) T4 DNS ligázt és 1,ul 10x tömény ligáz puffert adunk a DNS oldathoz és a kapott reakció-elegyet 16 °C-on éjszakán át inkubáljuk. A BclI linkerek az AccI-PvuII restrikciós fragmentnek csak a PvuII végéhez tudnak ligálódni. Későbbi DNS szekvenálással kiderült, hogy az AccI-PvuII restrikciós fragment PvuII végéhez négy BclI linker kapcsolódott. Ezeket az extra BclI linker-eket BclI-es emésztéssel és újra ligálással el lehet távolítani, azonban az extra BclI linker-eket nem távolítottuk el, mivel nem zavarják az extra linkert tartalmazó vektorok megfelelő működését.

Az E.coli K12HB101/pSV2cat törzs ATCC 37155 sorszám alatt hozzáférhető liofilezett formában az ATCC-nél és a pSV2cat plazmidot ezekből a sejtekből az 1. példában közölt leírás szerint izoláljuk. Körülbelül 1 mg pSV2cat DNS-t kapunk, ezt 1 ml TE pufferben oldjuk. Körülbelül 3,ug (3,ul) pSV2cat plazmid DNS-t adunk 2,ul 10x AccI pufferhez és 16,ul vízhez, majd ezután 3,ul (körülbelül 9 egység) AccI restrikciós enzimmet adunk a pSV2DNS oldatához és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az AccI restrikciós enzimmel emésztett pSV2cat plazmid DNS-t ezután

StuI restriktációs enzimmel emésztjük, 3,ul 10x tömény StuI puffert (1,0 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH = 8.0; 100 mM MgCl₂; 60 mM DTT és 1 mg/ml BSA), 5,ul vizet és körülbelül 2,ul (körülbelül 10 egység) StuI restriktációs enzimet adva az oldathoz. A kapott reakcióelegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A reakciót fenolos extrakcióval, majd kétszeri kloroformos extrakcióval állítjuk le. A kívánt fragmentből körülbelül 0,5,ug-ot kapunk, ezt 20,ul TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 4,ul AccI-StuI restriktációs enzimmel emésztett pSV2cat plazmid DNS-t az Ad2 ~ 0,32 kb méretű AccI-PvuII restriktációs fragment (BclI linkerekkel kiegészítve) 7,ul-es oldatához adunk, majd 3,ul 10x tömény ligáz puffer, 15,ul viz és 2,ul (körülbelül 1000 egység) T4 DNS ligáz hozzáadása után a ligálási reakciót 16 °C-on éjszakán át inkubáljuk. A ligált DNS molekula a kívánt pLPcat plazmid, amely ugy tartalmazza az Ad2 késői promoterét, hogy az képes legyen a kloramfenikol-acetiltranszferáz gén transzkripciójának és így expressziójának vezérlésére. A pLPcat plazmid restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 6. ábrán mutatjuk be.

A ligált DNS-t használjuk E.coli K12HB101 sejtek transzformálására, lényegében a 3. példában közölt eljárás szerint. A transzformált sejteket 50,ug/ml

ampicillint tartalmazó L agarra szélesztjük; a plazmid DNS restrikciós analízisét használjuk az E.coli K12HB101/pLPcat transzformánsok azonosítására. A pLPcat plazmid DNS-t lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint izoláljuk a transzformánsokból a további konstrukciók előállítása céljából.

B. A pBLcat plazmid előállítása

50, μ l TE pufferben lévő körülbelül 88, μ g pBKneo1 plazmid DNS-t adunk 7,5, μ l 10x AccI pufferhez, 30, μ l vízhez és 15, μ l (körülbelül 75 egység) AccI restrikciós enzimhez és a kapott reakció-elegyet 2 órán át inkubáljuk 37 °C-on. Az AccI restrikciós enzimmel emésztett BK vírus DNS-t agaróz gélre visszük, és a BK erősítő szakaszt tartalmazó $\sim$ 1,4 kb méretű fragmentet elválasztjuk a többi emésztési terméktől. A $\sim$ 1,4 kb méretű AccI restrikciós fragmentet ezután izoláljuk, lényegében a 12A. példában leírt eljárás szerint. A fragmentből körülbelül 5, μ g-ot oldunk 5, μ l 10x tömény PvuII pufferben, hozzáadunk 45, μ l vizet és 5, μ l (körülbelül 25 egység) PvuII restrikciós enzimet, és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Ezután a PvuII restrikciós enzimmel emésztett DNS-t izoláljuk és ligáláshoz előkészítjük lényegében a 12A. példában leírt eljárás szerint. Körülbelül 2, μ g-ot kapunk a kívánt $\sim$ 1,28 kb méretű AccI-PvuII

fragmentből és ezt 5,ul TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 1,ug pLPcat plazmid DNS-t oldunk 5,ul 10x tömény AccI pufferben és 40,ul vízben. Körülbelül 5,ul (~ 25 egység) AccI restrikciós enzimet adunk a pLPcat plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk. Az AccI restrikciós enzimmel emésztett pLPcat plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk és 5,ul 10x tömény StuI pufferben oldjuk, hozzá adunk 40,ul vizet és 5,ul (körülbelül 25 egység) StuI restrikciós enzimet és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az AccI-StuI restrikciós enzimekkel emésztett pLPcat plazmid DNS-t néhányszor kicsapjuk etanollal, hogy megtisztítsuk a ~4,81 kb méretű AccI-StuI restrikciós fragmentet, amely az E.coli replikációs origót és az Ad2 késői promotert a másik restrikciós emésztési terméktől, ami egy 16 bp méretű fragment. A kívánt ~4,81 kb méretű restrikciós fragmenből körülbelül 1,ug-ot kapunk, ezt 20,ul TE pufferben oldjuk.

5,ul ~4,81 kb méretű pLPcat AccI-StuI restrikciós fragmentet adunk 5,ul, a BK vírus ~1,28 kb méretű AccI-PvuII fragmentjét tartalmazó oldathoz. 3,ul 10x tömény ligáz puffer, 15,ul víz és 2,ul (körülbelül 1000 egység) T4 DNS ligáznak a DNS oldathoz adása után a kapott ligálási reakció-elegyet 16 °C-on éjszakán át inkubáljuk. A

ligált DNS molekula a kívánt pBLcat plazmid. A pBLcat plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 6. ábrán közöljük.

A ligált DNS-t használjuk E.coli K12HB101 sejtek transzformálására, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. Az E.coli K12HB101/pBLcat transzformánsokat plazmid DNS-ük restrikciós enzimes analízise alapján azonosítjuk. A pBLcat plazmid DNS-t a további munkákban használjuk, előállítását lényegében az 1. példában leírt eljárás szerinti végezzük.

13. példa

A pL133 plazmid előállítása

A. A pSV2-HPC8 intermediér plazmid előállítása

A pHC7 plazmid a humán C fehérjét kódoló gént tartalmaz. Egy liter, 15 µg/ml tetraciklint tartalmazó L-táptalajt oltunk E.coli K12RR1/pHC7 (NRRLB-15926) sejtekkel, majd a pHC7 plazmid DNS-t lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint izoláljuk és tisztítjuk. A pHC7 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 7. ábrán mutatjuk be. Ezzel az eljárással körülbelül egy mg pHC7 plazmid DNS-t kapunk, ezt 1 ml TE pufferben oldjuk, majd -20 °C-on oldjuk.

A pHC7 plazmid DNS oldatból 50 μ l-t keverünk 5 μ l ($\sim$ 50 egység) BanI restrikciós enzimhez, hozzáadunk 10 μ l 10x tömény BanI puffert (1,5 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH = 7,9; 60mM MgCl₂ és 1mg/ml BSA) és 35 μ l vizet, majd addig inkubáljuk, amíg az emésztés nem teljes. A BanI restrikciós enzimmal emésztett pHC7 plazmid DNS-t 3,5 %-os poliakrilamid gélen elektroforetizáljuk (29:1 arányu akrilamid: bisz-akrilamid), amíg a $\sim$ 1,25 kb méretű BanI restrikciós fragment elválik a többi restrikciós emésztési terméktől.

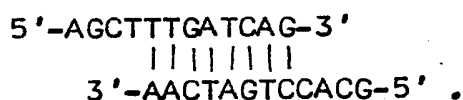
A 1,25 kb méretű BanI restrikciós fragmentet tartalmazó gél darabot kivágjuk a gélből, kémcsőbe tesszük és összezuzzuk. Egy ml extrakciós puffert (500 mM NH₄OAc, 10 mM MgOAc, 1 mM EDTA, 1 % SDS és 10 mg/ml tRNS) adunk a fragmentet tartalmazó csőbe, majd a csövet éjszakán át 37 °C-on inkubáljuk. Centrifugálással eltávolítjuk a törmelék^{uj}et és a felüluszt^{uj} csőbe visszük át. A törmelék^{uj}et egyszer mossuk 200 μ l extrakciós pufferrel, a mosó folyadékot egyesítjük az éjszakán át tartó extrakcióból származó első felüluszt^{uj}ával. A felüluszt^{uj}ot üveggyapoton, szűrjük át és két térfogat etanolt adunk hozzá. A kapott oldatot $\sim$ 10 percre etanol-szárazjég fürdőbe tesszük, majd a DNS-t centrifugálással kinyerjük.

Ezzel az eljárással körülbelül 8 μ g-ot kapunk a $\sim$ 1,25 kb méretű BanI restrikciós fragmentből. A tisztított fragmentet 10 μ l TE pufferben oldjuk és -20°C -on tároljuk. A BanI restrikciós fragmentet módosítani kell linker hozzáadásával, hogy előállíthassuk a pSV2-HPC8 plazmidot.

A linker mindegyik egyszálu részének ötszáz pikomólját foszforilezzük 20 μ l reakciópufferben, amely 15 egység ($\sim$ 0,5 μ l) T4 polinukleotid kinázt, 2 μ l 10x tömény ligáz puffert, 10 μ l 500 μM ATP-t és 7,5 μ l vizet tartalmaz. A foszforilezési reakciót 30 percig 37°C -on tartjuk, majd 10 perces 100°C -os inkubálással leállítjuk. A teljes foszforilezés biztosítása céljából a reakcióelegyet jégbe hűtjük, 2 μ l 0,2 M ditiotreitolt, 2,5 μ l 5 mM ATP-t és 15 egység T4 polinukleotid kinázt adunk hozzá és további 30 percig 37°C -on inkubáljuk. A reakció leállításához az elegyet újabb 10 percig 100°C -on tartjuk, majd jégbe hűtjük.

Jóllehet külön lettek foszforilezve a DNS linker két külön láncát összekeverjük a kináz reakció után. A láncok egymás mellé illesztéséhez a kináz reakcióelegyet 10 percig 100°C -on inkubáljuk $\sim$ 150 ml vizet tartalmazó vízfürdőben. Ezután az inkubálás után a vízfürdő fűtését kikapcsoljuk és hagyjuk szobahőmér-

sékletre hűlni, ami egy körülbelül három órát igénybe-
 vevő folyamat. A foszforilezett DNS-t tartalmazó cső-
 vet a vízfürdővel éjszakán át 4 °C-on inkubáljuk. Ez az
 eljárás egymás mellé illeszti az egyszálú DNS-eket. A
 készített linker szerkezete:



A linkert további felhasználásig -20 °C-on
 tároljuk.

8, μ g $\sim$ 1,25 kb méretű BanI fragmentet adunk
 $\sim$ 50, μ l linkerhez ($\sim$ 500 pikomól), majd ehhez az elegy-
 hez 1, μ l T4 DNS ligázt ($\sim$ 500 egység), 10, μ l 10x tömény
 ligáz puffert és 29, μ l vizet adunk, majd a kapott ligáz
 reakció-elegyet 4 °C-on éjszakán át inkubáljuk. A ligáz
 reakciót 10 perces 65 °C-os inkubálással állítjuk le. A
 DNS-t kicsapjuk, Na-acetátot adva az oldathoz 0,3 M vég-
 koncentrációban, ehhez két térfogat etanolt adunk, etanol-
 -szárazjég fürdőbe tesszük, majd lecentrifugáljuk a csapa-
 dékot.

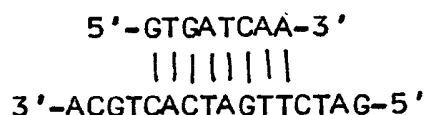
A DNS csapadékot 10, μ l 10x tömény ApaI reak-
 ció pufferben oldjuk (60 mM NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH=7,4;
 60 mM MgCl₂ és 60 mM 2-merkaptó-etanol) hozzáadunk 5, μ l
 ($\sim$ 50 egység) ApaI restrikciós enzimet és 85, μ l vizet majd
 a reakció-elegyet két órára 37 °C-ra tesszük. A reakciót

ezután a fentiek szerint leállítjuk és a DNS-t kicsapjuk. A DNS csapadékot 10, μ l 10x tömény HindIII reakció-pufferben oldjuk, 5, μ l ($\sim$ 50 egység) HindIII restriktációs enzimet adunk hozzá és 85, μ l vizet, majd a reakció-elegyet két órára 37 °C-ra tesszük. A HindIII restriktációs enzimmel végzett emésztés után a reakció-elegyet 3,5 %-os poliakrilamid géltre viesszük és a $\sim$ 1,23 kb méretű HindIII-ApaI restriktációs fragmentet izoláljuk, lényegében a 12A. példában közölt eljárást követve. A kívánt fragmentből körülbelül 5, μ g-ot kapunk, ezt 10, μ l TE pufferben oldjuk, majd -20 °C-on tároljuk.

A pH7 plazmid DNS-ből ötven, μ l-t elegyítünk 5, μ l ($\sim$ 50 egység) PstI restriktációs enzimmel, hozzáadunk 10, μ l 10x tömény PstI reakció-puffert (1,0 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH = 7.5; 100 mM MgCl₂ és 1 mg/ml BSA), 35, μ l vizet és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. A PstI restriktációs enzimmel emésztett pH7 plazmid DNS-t ezután 3,5 %-os poliakrilamid gélen elektroforetizáljuk, majd a kívánt $\sim$ 0,88 kb méretű fragmentet a fent leírt eljárás szerint tisztítjuk. Körülbelül 5, μ g-ot kapunk a kívánt fragmentből, ezt 10, μ l TE pufferben oldjuk és -20 °C-on tároljuk.

A körülbelül 5, μ g-nyi mennyiségű $\sim$ 0,88 kb méretű PstI fragmentet hozzákeverjük $\sim$ 50, μ l, a következő

összetételű linkerhez, amelyet automata DNS -szintetizátorral állítunk elő.



Körülbelül 1, μ l T4 DNS ligázt (~ 10 egység), 10, μ l 10x tömény ligáz puffert és 29, μ l vizet adunk a DNS keverékhez és a kapott ligálási reakció-elegyet éjszakán át 4 $^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk.

A ligálási reakciót az elegy 10 perces 65 $^{\circ}\text{C}$ -os inkubálásával állítjuk le. A ligált DNS kicsapása után a DNS-csapadékot 10, μ l 10x tömény ApaI reakció-pufferben oldjuk, 5, μ l (~ 50 egység) ApaI restrikciós enzimet és 85, μ l vizet adunk hozzá, majd a reakció-elegyet két órára 37 $^{\circ}\text{C}$ -ra tesszük. A reakciót ezután leállítjuk, majd a DNS-t újra kicsapjuk. A DNS csapadékot ezután 10, μ l 10x tömény BglII reakció-puffer (1 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 100 mM MgCl_2 ; 100 mM 2-merkapto-etanol és 1 mg/ml BSA) 5, μ l (~ 50 egység) BglII restrikciós enzim és 85, μ l víz összetételű elegyben oldjuk, majd a reakció-elegyet két órára 37 $^{\circ}\text{C}$ -ra tesszük. A BglII restrikciós enzimmel végzett emésztés után a reakció-elegyet 3,5 %-os poliakrilamid gélre visszük, és a kívánt $\sim 0,19$ kb méretű ApaI-BglII restrikciós fragmentet izoláljuk, lényegében a fent leírt

eljárás szerint. A kívánt fragmentból körülbelül 1 μ g-ot kapunk, 10 μ l TE pufferben oldjuk majd -20 °C-on tároljuk.

Körülbelül 10 μ l pSV2gpt plazmid DNS-t (ATCC 37145) oldunk 10 μ l 10x tömény HindIII reakció-puffer, 5 μ l ($\sim$ 50 egység) HindIII restrikciós enzim és 85 μ l H₂O összetételű oldatban és a reakció-elegyet 2 órára 37 °C-ra tesszük. A reakció-elegyen 0,25 M Na-acetát koncentrációt állítunk be, majd két térfogat etanol hozzáadása és etanol-szárazjég fürdőben végzett inkubálás után a DNS csapadékot centrifugálással kinyerjük. A DNS csapadékot 10 μ l 10x tömény BglII puffer, 5 μ l ($\sim$ 50 egység) BglII restrikciós enzim és 85 μ l víz összetételű, oldatban oldjuk, majd a reakció-elegyet két órán át 37 °C-ra helyezzük. A BglII restrikciós enzimmel végzett emésztés után a reakció-elegyet 1 %-os agaróz-gélra vesszük és a fragmenteket elektroforézissel elválasztjuk. A gél etidium-bromiddal festjük és ultraibolya fénnel tesszük láthatóvá, majd a kívánt $\sim$ 5,1 kb méretű HindIII-BglII fragmentet tartalmazó csíkot kivágjuk a gélből és dializáló hüvelybe tesszük. Az elektroforézist ezután addig folytatjuk, amíg a DNS kilép az agarózból. A DNS-t tartalmazó puffert kiszívjuk dializáló hüvelyből, fenollal és kloroformmal extraháljuk, majd a DNS-t kicsap-

juk. A csapadékot 10, μ l TE pufferben oldjuk, így tároljuk a pSV2 gpt plazmid ~ 5 , μ g mennyiségű $\sim 5,1$ kb méretű HindIII-BglII restrikciós fragmentjét.

A $\sim 1,23$ kb méretű HindIII-ApaI restrikciós fragmentből két, μ l-t a $\sim 0,19$ kb méretű ApaI-BglII fragmentből 3, μ l-t és a $\sim 5,1$ kb méretű HindIII-BglII fragmentből 2, μ l-t összekeverünk, majd 10, μ l 10x tömény ligáz puffer, 1, μ l T4 DNS ligáz (~ 500 egység) és 82, μ l víz összetételű oldatban 16 $^{\circ}$ C-on éjszakán át inkubáljuk. A ligálással kapott DNS-molekula a kívánt pSV2-HPC8 plazmid. A pSV2-HPC8 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 7. ábrán közöljük.

Az E.coli K12RR1 (NRRL B-15210) sejteket a transzformációra alkalmassá (kompetenssé) lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint tesszük. A fentiek szerint előállított ligált DNS-t használjuk a sejtek transzformálására, majd a transzformációs keverék alikvot részét 100, μ g/ml ampicillint tartalmazó L-agarlemezre szélesztjük. A lemezeket ezután 37 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk. Az E.coli K12RR1/pSV2-HPC8 transzformánsokat plazmid DNS-ük restrikciós analízisével azonosítjuk.

B. A pL133 plazmid előállítása

A pSV2-HPC9 plazmidból ötven, μg -ot oldunk 10, μl 10x tömény HindIII reakció-puffer, 5, μl (~ 50 egység) HindIII restrikciós enzim és 85, μl víz összetételű oldatban, majd a reakció elegyet két órán át 37°C -on inkubáljuk. A HindIII restrikciós enzimmel végzett emésztés után a DNS-t kicsapjuk, majd a DNS csapadékot 10, μl 10x tömény SalI reakció puffer (1,5 M NaCl, 60 mM Tris-HCl, pH= 7,9; 60 mM MgCl_2 ; 60 mM merkapto-etanol és 1 mg/ml BSA), 5, μl (~ 50 egység) SalI restrikciós enzim és 85, μl víz összetételű oldatban oldjuk. A kapott SalI reakció-elegyet két órán át 37°C -on inkubáljuk. A HindIII-SalI restrikciós enzimekkel emésztett pSV2-HPC8 plazmidot 3,5 %-os poliakrilamid gélre visszük, majd addig elektroforetizáljuk, amíg a kívánt $\sim 0,29$ kb méretű HindIII-SalI restrikciós fragment elválik a többi reakció-terméktől. A kívánt fragmentet izoláljuk a gélből; a fragmentből körülbelül 2, μg -ot kapunk, ezt 10, μl TE pufferben oldjuk.

Ötven, μg pSV2-HPC8 plazmid DNS-t 10, μl 10x tömény BglII reakció-puffer, 5, μl (50 egység) BglII restrikciós enzim és 85, μl víz összetételű oldatban oldunk, majd a kapott reakció-elegyet két órán

37 °C-on inkubáljuk. A BglIII restrikciós enzimmel végzett emésztés után a DNS-t kicsapjuk, a DNS csapadékot 10, μ l 10x tömény SalI reakciópuffer, 5, μ l ($\sim$ 50 egység) SalI restrikciós enzim és 85, μ l víz összetételű oldatban oldjuk. A kapott SalI reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. A SalI-BglIII restrikciós enzimekkel emésztett pSV2-HPC9 plazmidot ezután 3,5 %-os poliakrilamid gélre visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg a kívánt $\sim$ 1,15 kb méretű SalI-BglIII restrikciós fragment el nem válik az emésztési reakció többi termékétől. A $\sim$ 1,15 kb méretű SalI-BglIII restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből; a kapott körülbelül 8, μ g fragmentet 10, μ l TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 10, μ g pSV2-béta-globin plazmid DNS-t (NRRL B-15928) oldunk 10, μ l 10x tömény HindIII reakció-puffer, 5, μ l ($\sim$ 50 egység) HindIII restrikciós enzim és 85, μ l víz összetételű oldatban, majd a reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A reakció-elegyben ezután 0,25 M Na-acetát koncentrációt állítunk be, majd két térfogat etanol hozzáadása és etanol-szárazjég fürdőben való inkubálás után a DNS csapadékot centrifugálással kinyerjük. A HindIII restrikciós enzimmel emésztett pSV2-béta-globin plazmidot

10,ul 10x tömény BglII puffer, 5,ul (~50 egység)
BglII restrikciós enzim és 85,ul víz összetételű
oldatban oldjuk, majd a reakció-elegyet két órán át
37 °C-on oldjuk. A BglII restrikciós enzimmel vég-
zett emésztés után a reakció-elegyet 1 %-os agaróz
gélre visszük és a fragmenteket elektroforézissel el-
választjuk. A kívánt ~ 4,2 kb méretű HindIII-BglII
restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből; a kívánt
fragmentből körülbelül 5,ug-ot kapunk, ezt 10,ul TE
pufferben oldjuk.

A pSV2-HPC8 plazmid 0,29 kb méretű HindIII-
-SalI fragmentjéből két ,ul-t, a pSV2-HPC8 plazmid
~ 1,15 kb méretű SalI- BglII fragmentjéből 2,ul-t és a
pSV2-béta-globin plazmid ~ 4,2 kb méretű HindIII-BglII
fragmentjéből 2,ul-t összekeverünk, majd összeligálunk
a 13A. példában leírt eljárás alapján. Az össze-
ligált DNS molekula a kívánt pL133 plazmid. A pL133 plaz-
mid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok
közt a 7. ábrán mutatjuk be. A kívánt E.coli K12RR1/
pL133 transzformánsokat a 16A. példában leírt eljárás sze-
rint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy a pSV2-
-HPC8 plazmid helyett pL133 plazmiddal transzformálunk.

14. példaA pLPC plazmid előállítása

Körülbelül 20, μ g pBLCat plazmid DNS-t oldunk 10, μ l 10x tömény HindIII reakció-puffer és 80, μ l víz összetételű oldatban. A pBLCat plazmid DNS oldatához körülbelül 10, μ l (~ 100 egység) HindIII restrikciós enzimet adunk és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. A HindIII restrikciós enzimmel emésztett pBLCat plazmid DNS-t agaróz gélra visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg a $\sim 0,87$ kb méretű HindIII restrikciós fragment, amely a BK erősítő szakaszt és az Ad2 késői promoterét tartalmazza, el nem válik a többi emésztési terméktől; ezután a $\sim 0,87$ kb méretű fragmentet izoláljuk és előkészítjük ligáláshoz, lényegében a 12A. példában közölt leírás szerint. A kívánt fragmentből körülbelül 2, μ g-ot kapunk, ezt 5, μ l TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 1,5, μ g pL133 plazmid DNS-t oldunk 2, μ l 10x tömény HindIII pufferben és 16, μ l vízben. Körülbelül 1, μ l (~ 10 egység) HindIII restrikciós enzimet adunk a DNS oldathoz, és a kapott reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk két órán át. A DNS-t ezután 100, μ l-re higitjuk TE pufferrel, és borjubél alkalikus foszfátazzal kezeljük, lényegében a 7. példában leírt eljárás szerint. A HindIII restrikciós enzimmel emésztett pL133 plazmid DNS-t kétszer

extrahááljuk fenollal, egyszer kloroformmal, etanollal kicsapjuk, majd 10,ul TE pufferben oldjuk.

A pBLcat plazmid $\approx 0,87$ kb méretű HindIII restrikcións fragmentjéből körülbelül 5,ul-t adunk 1,5,ul HindIII restrikcións enzimmel emésztett pL133 plazmidhoz, majd 1,ul 10x tömény ligáz puffert, 1,ul (~ 1000 egység) T4 DNS ligázt és 1,5,ul vizet adunk a DNS oldathoz, és a kapott reakción-elegyet 16 °C-on éjszakán át inkubáljuk. Az összeligált DNS molekula a kívánt pLPC plazmid. A pLPC plazmid restrikcións és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 8. ábrán mutatjuk be.

A ligált DNS-t használjuk E.coli K12HB101 törze transzformálására, lényegében a 3. példában leirt eljárás szerint. A transzformált sejteket ampicillin-tartalmu L-agarlemezre szélesztjük, és az ampicillin-rezisztens transzformánsok plazmid DNS-ét restrikcións enzimemésztéssel analizáljuk az E.coli K12 HB101/pLPC transzformánsok azonosítása céljából. A BK erősítő szekvenciát és az Ad2 késői promotert tartalmazó $\sim 0,87$ kb méretű HindIII restrikcións fragmentet a HindIII restrikcións enzimemésztett pL133 plazmidba két különböző orientációnban építhetjük be, és azt a konstrukciónt nevezzük pLPC-nek, amely egy $\sim 1,0$ kb méretű NdeI-StuI restrikcións fragmentet tartalmaz.

15. példaA pLPChyg1 és pLPChyg2 plazmidok elő-
állítás

Az *E.coli* K12RR1/pSV2hyg törzs NRRL B-18039 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratóriumnál. A pSV2hyg DNS-t, a sejtekből az 1. példában leírt eljárás alapján nyerjük ki. A pSV2hyg plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 8. ábrán mutatjuk be.

Körülbelül 10 µg 10 µl TE pufferben oldott pSV2hyg plazmid DNS-t adunk 2 µl 10x tömény BamHI pufferhez és 6 µl vízhez. A DNS-oldathoz körülbelül 2 µl (körülbelül 20 egység) BamHI restrikciós enzimet adunk, majd a kapott reakció-elegyet 37 °C-on két órán át inkubáljuk. A reakció-elegyet először fenollal extraháljuk, majd kétszer kloroformmal. A BamHI restrikciós enzimmal emésztett pSV2hyg DNS-t agaróz gélre visszük, majd a körülbelül 2,5 kb méretű restrikciós fragmentet lényegében a 12A. példában leírt eljárással izoláljuk.

Körülbelül 5 µl 10x tömény Klenow puffert (0,2 mM mindegyik dezoxinukleotidból, 0,5 M Tris-HCl, pH = 7,8; 50 mM MgCl₂; 0,1 M 2-merkaptó-etanol és 100 µg/ml BSA) és 35 µl vizet adunk a BamHI restrikciós enzimmal emésztett pSV2hyg plazmid DNS-hez. Majd körülbelül 25 egység Klenow enzimet (körülbelül 5 µl, a BRL kisé-

relésében) adunk a DNS keverékhez és a reakcióelegyet 16 °C-on 30 percig inkubáljuk. A Klenow fragmenttel kezelt BamHI restrikciós enzimmel emésztett pSV2hyg plazmid DNS-t egyszer extraháljuk fenollal és egyszer kloroformmal, majd etanollal kicsapjuk. A kívánt fragmentből körülbelül 2, μ g-ot kapunk és ezt 5, μ l TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 10, μ g (10, μ l) pLPC plazmid DNS-t adunk 2, μ l 10x StuI pufferben és 6, μ l vízhez. A DNS oldathoz körülbelül 2, μ l ($\sim 10^3$ egység) StuI restrikciós enzimet adunk, majd a reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A StuI restrikciós enzimmel emésztett pLPC plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 2, μ l 10x tömény NdeI reakció-puffer (1,5 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH = 7,8; 70 mM MgCl₂; 60 mM 2-merkaptó-etanol és 1 mg/ml BSA) és 16, μ l víz összetételű oldatban oldjuk. Körülbelül 2, μ l (~ 10 egység) NdeI restrikciós enzimet adunk a StuI-restrikciós enzimmel emésztett plazmid DNS-hez, majd a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk.

Az NdeI-StuI restrikciós enzimekkel emésztett pLPC plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 5, μ l 10x tömény Klenow puffer és 40, μ l víz összetételű oldatban oldjuk. A DNS oldathoz kö-

körülbelül 5, μ l (~ 25 egység) Klenow enzimet adunk, majd a kapott reakció-elegyet 16 $^{\circ}$ C-on 30 perc után agaróz gélre visszük és a $\sim 5,82$ kb méretű NdeI-StuI restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből. A kívánt fragmentből körülbelül 5 μ g-ot kapunk, ezt 5 μ l TE pufferben oldjuk.

A pSV2hyg plazmidből származó $\sim 2,5$ kb méretű Klenow-fagmenttel kezelt, BamHI restrikciós fragmentjéből körülbelül 2 μ l-t keverünk körülbelül 1 μ l, a pLPC plazmidből származó $\sim 5,82$ kb méretű Klenow fragmenttel kezelt NdeI-StuI restrikciós fragmenttel, majd a DNS oldathoz adunk körülbelül 3 μ l 10x tömény ligáz puffert, 2 μ l T4 DNS ligázt (~ 1000 egység), 1 μ l T4 RNS ligázt (~ 1 egység) és 14 μ l vizet. A kapott reakció-elegyet éjszakán át 16 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk. Az összeligált DNS molekulák a kívánt pLPChyg1 és pLPChyg2 plazmidok, amelyek csak a $\sim 2,5$ kb méretű, Klenow fragmenttel kezelt BamHI restrikciós fragment beépülési orientációjában különböznek. A pLPChyg1 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 8. ábrán közöljük. A ligált DNS-t használjuk E.coli K12HB101 törzsek transzformálására, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A kívánt E.coli K12HB101/pLPChyg1 és E.coli K12HB101/pLPChyg2 transzformánsokat ampicillin-tartalmú L agarlemezre széleszt-

jük, majd plazmid DNS-ük restrikciós enzimes analízisével azonosítjuk.

16. példa

A pBW32 plazmid előállítása

A. A pTPA103 intermediér plazmid előállítása

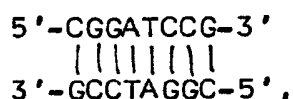
A pTPA plazmid a humán szöveti plazminogén aktivátor (TPA) kódoló szekvenciáját tartalmazza. A pTPA102 plazmidot E.coli K12 MM294/pTPA102 törzsből lehet izolálni, amely törzs NRRL B-15834 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratory-nál. A pTPA 102 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 9. ábrán közöljük. A pTPA plazmid DNS-t lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint izoláljuk.

Körülbelül 50 µg pTPA102 plazmid DNS-t (körülbelül 50 µl TEpufferben) adunk 10 µl 10x tömény Tth 111I reakció-puffer (0,5 M NaCl; 80 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 80 mM MgCl₂; 80 mM 2-merkapto-etanol és 1 mg/ml BSA) és 80 µl viz összetételű oldatban oldjuk. Körülbelül 10 µl (~50 egység) Tth111I restrikciós enzimet adunk a DNS-oldathoz és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 65 °C-on inkubáljuk. A reakció-elegyet agaróz gélre viesszük, majd izoláljuk a gélből a ~4,4 kb méretű Tth111I restrikciós fragmentet, amely a TPA kódoló

szekvenciát tartalmazza. A többi emésztési terméket, a 3,1 és 0,5 kb méretű restriktációs fragmenteket kidobjuk. A kívánt $\sim 4,4$ kb méretű Tth111I restriktációs fragmentből körülbelül 10 μ g-ot kapunk, ezt 10 μ l TE pufferben oldjuk.

A 4,4 kb méretű Tth111I restriktációs fragmentet, tartalmazó oldathoz körülbelül 5 μ l 10x tömény Klenow puffert és 30 μ l vizet adunk, majd további 5 μ l Klenow enzim (~ 5 egység) hozzáadása után a reakció-elegyet további 30 percig inkubáljuk 16 $^{\circ}$ C-on. A Klenow reakció után a DNS-t etanollal kicsapjuk, majd 3 μ l 10x tömény ligáz puffer és 14 μ l víz összetételű oldatban oldjuk.

A következő szekvenciájú BamHI linkereket:



foszforilezzük, majd a következő eljárással készítjük elő ligáláshoz. Négy μ l linkert ($\sim 2 \mu$ g) oldunk 20,15 μ l vízben, 5 μ l 10x tömény kináz puffert adunk hozzá (500 mM Tris-HCl, pH= 7,6 és 100 mM MgCl₂), két percig 90 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk, majd szobahőmérsékletre hűtjük. Az elegyhez 5 μ l γ^{32} -P-ATP-t ($\sim 20 \mu$ Ci), 2 μ l 1M DTT-t és 5 μ l polinukleotid kinázt (~ 10 egység) adunk, majd

37 °C-on 30 percig inkubáljuk. Ezután 3,35 µl 0,01 M ATP-t és 5 µl kinázt adunk hozzá, majd a reakciót további 30 percig hagyjuk futni 37 °C-on. A radioaktív ATP segít annak eldöntésében, hogy a linker ligálódott-e a cél DNS-be.

A foszforilezett BamHI linkerből 10 µl-t adunk a ~ 4,4 kb méretű Tth111I méretű restrikciós fragment oldatához, majd 2 µl T4 DNS ligáz (~ 1000 egység) és 1 µl T4 RNS ligáz (~ 2 egység) hozzáadása után a ligálási reakciót éjszakán át 4 °C-on inkubáljuk. A ligált DNS-t etanollal kicsapjuk, majd 5 µl 10x tömény HindIII pufferben oldjuk és 40 µl vizet adunk hozzá. A DNS-oldathoz körülbelül 5 µl (~ 50 egység) HindIII restrikciós enzimet adunk és a kapott reakció-elegyet 37 °C-on 2 órán át inkubáljuk.

A HindIII restrikciós enzimmel emésztett DNS-t etanollal kicsapjuk, majd 10 µl 10x tömény BamHI puffer és 90 µl víz összetételű oldatban oldjuk. Körülbelül 10 µl (~ 100 egység) BamHI restrikciós enzimet adunk a DNS oldathoz, majd a kapott reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk két órán át. A BamHI restrikciós enzimmel végzett emésztés után a reakció-elegyet agaróz gélre visszük, majd a ~ 2,0 méretű BamHI-HindIII restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből. A kívánt fragmentből kö-

rűlbelűl 4,ug-ot kapunk, ezt körülbelűl 5,ul TE pufferben oldjuk.

A pTPA103 plazmid előállítás céljából a pTPA102 plazmidból származó $\sim 2,0$ kb méretű BamHI-HindIII restrikciós fragmentet a BamHI-HindIII restrikciós enzimekkel emésztett pRC plazmidba építjük be. A pRC plazmidot úgy állítjuk elő, hogy egy ~ 288 bp méretű EcoRI-ClaI^{tartalmazza a} restrikciós fragmentet, amely az E.coli trp operon promoter és operátor (trpPO) szekvenciáját EcoRI-ClaI restrikciós enzimekkel emésztett pKC7 plazmidba építjük be. A pKC7 plazmid az ATCC 37084 sorszám alatt az American Type Culture Collection-nál hozzáférhető E.coli K12 N100/pKC7 törzsből állítható elő. A trpPO szekvenciát tartalmazó ~ 288 bp méretű EcoRI-ClaI restrikciós fragmentet az E.coli K12 MM294/pTPA102 (NRRL B-15834) törzsből izolálható pTPA102 plazmidból állítjuk elő. A pKC7 és pTPA102 plazmid DNS-t az emésztett sejtvonalakból állíthatjuk elő lényegében az 1. példában közölt eljárás szerint. Ez a $\sim 0,29$ kb méretű EcoRI-ClaI restrikciós fragment tartalmazza a transzkripciós aktiváló szekvenciát, valamint a translációs aktiváló szekvencia legnagyobb részét az E.coli trp génből, szekvenciája a következő:

- 106 -

```

      10      20      30      40      50
5'-AATTCACGCT GTGGTGTAT GGTGGTGGT CGCTAGGGTG CCGACGCGCA
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      3'-GTGCGA CACCACAATA CCAGCCACCA GCGATCCCAC GGCTGCGCGT

      60      70      80      90     100
TCTCGACTGC ACGGTGCACC AATGCTTCTG GCGTCAGGCA GCCAATCGGA
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
AGAGCTGACG TGCCACGTGG TTACGAAGAC CGCAGTCCGT CGGTTAGCCT

      110     120     130     140     150
AGCTGTGGTA TGGCTGTGCA GGTCTGTATA TCACCGCATA ATTCGAGTCG
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
TCGACACCAT ACCGACACGT CCAGCATATT AGTGGCGTAT TAAGCTCAGC

      160     170     180     190     200
CTCAAGGCGC ACTCCCGTTC CGGATAATGT TTTTGTCTCC GACATCATAA
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GAGTTCCGCG TGAGGGCAAG GCCTATTACA AAAAACGAGG CTGTAGTATT

      210     220     230     240     250
CGGTTCCGGC AAATATTCTG AAATGAGCTG TTGACAATTA ATCATCGAAC
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GCCAAGGCCG TTTATAAGAC TTTACTCGAC AACTGTTAAT TAGTAGCTTG

      260     270     280     287
TAGTAACTA GTACGCAAGT TCTCGTAAAA AGGGTAT-3'
   ||||| ||||| ||||| |||||
ATCAATTGAT CATGCGTTCA AGAGCATTTT TCCCATAGC-5'

```

Igy, a pRC plazmid előállítása céljából körülbelül 2, μ g, 10, μ l TE pufferben oldott pKC7 plazmidot adunk 2, μ l 10x tömény ClaI puffer (0,5 M NaCl, 60 mM Tris-HCl, pH = 7.9; 60 mM MgCl₂ és 1 mg/ml BSA) és 6, μ l víz elegyéhez. Körülbelül 2, μ l ($\sim$ 10 egység)

ClaI restrikciós enzimet adunk a pKC7 plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A ClaI restrikciós enzimmel emésztett pKC7 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, majd 2,ul 10x tömény EcoRI puffer és 16,ul víz elegyében oldjuk. Körülbelül 2,ul (~10 egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk a ClaI restrikciós enzimmel emésztett pKC7 plazmid DNS oldatához, és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk.

Az EcoRI-ClaI restrikciós enzimekkel emésztett pKC7 plazmid DNS-t egyszer fenollal, majd kétszer kloroformmal extraháljuk. A DNS-t ezután etanollal kicsapjuk, és 3,ul 10x tömény ligáz puffer és 20,ul víz elegyében oldjuk. A pKC7 plazmid restrikciós és funkciós térképe a Molecular Cloning kézikönyv 8. oldalán található (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Körülbelül 20,ug pTPA102 plazmid körülbelül 20,ul-es TE pufferes oldatát 10,ul 10x tömény ClaI puffer és 60,ul víz elegyéhez adjuk. A pTPA 102 plazmid DNS-hez körülbelül 10,ul (~ 50 egység) ClaI restrikciós enzimet ^{adunk,} majd a kapott reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk 2 órán át. A ClaI restrikciós enzimmel emésztett pTPA102 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, majd 10,ul 10x tömény

EcoRI puffer és 80 μ l víz elegyében oldjuk. Körülbelül 10 μ l ($\sim$ 50 egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk a ClaI restrikciós enzimmel emésztett pTPA102 plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 37 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk 2 órán át.

Az EcoRI-ClaI restrikciós enzimekkel emésztett pTPA102 plazmid DNS-t egyszer fenollal extraháljuk, majd 7 %-os poliakrilamid gélra visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg a trpPO szekvenciát tartalmazó $\sim$ 288 bp méretű EcoRI-ClaI restrikciós fragment elválik a többi emésztési terméktől. A $\sim$ 288 bp méretű EcoRI-ClaI restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből; körülbelül 1 μ g-ot kapunk a kívánt fragmentből, ezt 5 μ l TE pufferben oldjuk és a fentiek szerint előállított EcoRI-ClaI restrikciós enzimekkel emésztett pKC7 plazmid DNS oldatához adjuk. Körülbelül 2 μ l ($\sim$ 1000 egység) T4 DNS ligázt adunk a DNS keverékhez, és a kapott ligálási reakciót 16 $^{\circ}$ C-on inkubáljuk 2 órán át. A ligált DNS molekula a kívánt pRC plazmid DNS.

A ligált DNS-t használjuk kompetens *E. coli* K12 HB101 sejtek transzformálására, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A transzformált sejteket 100 μ g/ml ampicillint tartalmazó L-agarlemezre szétosztjuk,

és az ampicillin rezisztens transzformánsokat plazmid DNS-ük restrikciós enzim analízisével vizsgáljuk, hogy a kívánt *E.coli* K12HB101/pRC telepeket azonosítsuk. Az *E.coli* K12HB101ZpRC transzformánsokból a pRC plazmid DNS-t lényegében a 2. példában leírt eljárás alapján nyerjük ki.

Körülbelül 2, μ g pRC plazmid DNS 2, μ l TE pufferes oldatát 2, μ l 10x tömény HindIII puffer és 16, μ l víz oldatához adjuk. A HindIII restrikciós enzimből körülbelül 2, μ l-t (~ 10 egység) adunk a pRC plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk két órán át. A HindIII restrikciós enzimmel emésztett pRC plazmidot etanollal kicsapjuk, majd 2, μ l 10x tömény BamHI puffer és 16, μ l víz elegyében oldjuk. Körülbelül 2, μ l (~ 10 egység) BamHI restrikciós enzimmet adunk a HindIII restrikciós enzimmel emésztett pRC plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 37 °C-on inkubáljuk 2 órán át.

A BamHI-HindIII restrikciós enzimekkel emésztett pRC plazmid DNS-t egyszer extraháljuk, fenollal, majd kétszer kloroformmal. A DNS-t etanollal kicsapjuk és 3, μ l 10 tömény ligáz puffer és 20, μ l víz ele-

gyében oldjuk. A pTPA102 plazmid $\sim 2,0$ kb méretű HindIII-BamHI restrikciós fragmentből ~ 4 ug-ot (~ 5 ul TE pufferben) adunk a BamHI-HindIII restrikciós enzimekkel emésztett pRC plazmid DNS oldatához. Körülbelül 2 ul (~ 1000 egység) T4 DNS ligázt adunk a DNS elegyhez és a kapott reakció-elegyet 16°C -on inkubáljuk 2 órán át. A ligált DNS molekula a kívánt pTPA103 plazmid DNS.

A nemkívánt transzformánsok számának csökkentése céljából a ligált DNS-t NcoI restrikciós enzimmel emésztjük, amely hasítja a pRC plazmidot, de nem hasítja a pTPA103 plazmidot. A ligált DNS NcoI restrikciós enzimmel való emésztése csökkenti a nemkívánt transzformánsok számát, mivel a linearizált DNS sokkal kisebb frekvenciával transzformálja az E.coli-t mint a zárt, cirkuláris DNS. A ligált DNS emésztéséhez a DNS-t először etanollal kicsapjuk, majd 2 ul $10\times$ tömény NcoI puffer ($1,5$ M NaCl; 60 mM Tris-HCl pH = $7,8$; 60 mM MgCl_2 és 1 mg/ml BSA) és 16 ul víz elegyében oldjuk. Körülbelül 2 ul (~ 20 egység) NcoI restrikciós enzimmet adunk a DNS oldathoz, és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37°C -on inkubáljuk.

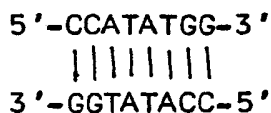
A ligált, majd NcoI restrikciós enzim-mel emésztett plazmid DNS-t használjuk E.coli K12RV308 (NRRL B-15624) törzs transzformálására. Kompetens E.coli K12RV308 sejteket és a kompetens sejtek transzformálását lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint végezzük. A transzformációs elegyet 100 µg/ml ampicillint tartalmazó L agar-lemezre szélesztjük. Az ampicillin rezisztens transzformánsoknak megvizsgáljuk a kanamicin érzékenységet, mivel a pRC plazmid tartalmaz kanamicin rezisztenciagént, a pTPA103 plazmid nem. Az ampicillin rezisztens kanamicin érzékeny transzformánsokból izolálunk plazmid DNS-t és a plazmid DNS-t restrikciós enzimes analízissel vizsgáljuk az E.coli K12RV308/pTPA103 transzformánsok azonosítására. A pTPA103 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 9. ábrán közöljük. A pTPA103 plazmid DNS-t az E.coli K12RV308/pTPA103 sejtekből állítjuk elő, lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint.

B. A pBW25 intermediér plazmid előállítása

Körülbelül 1 µg pTPA103 plazmid DNS 1 µl TE pufferben készült oldatát 2 µl 10x tömény BglII reakciópufferhez és 16 µl vízhez adjuk. Körülbelül

1,ul (~ 5 egység) BglII restrikciós enzimet adunk a pTPA103 plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37°C -on inkubáljuk. A BglII restrikciós enzimmel emésztett pTPA103 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk és 5,ul 10x tömény Klenow puffer valamint 44,ul víz elegyében oldjuk. Körülbelül 1,ul Klenow enzimet (~ 1 egység) adunk a BglII restrikciós enzimmel emésztett pTPA103 plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 16°C -on inkubáljuk. A Klenow-fragmenttel kezelt BglII restrikciós enzimmel emésztett pTPA103 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, majd 3,ul 10x tömény ligáz puffer és 22,ul víz elegyében oldjuk.

Körülbelül 2,ul ($\sim 0,2\text{ug}$) foszforilezetlen NdeI linkert (New England Biolabs), amelynek nukleotid szekvenciája a következő:



adunk a Klenow fragmenttel kezelt, BglII restrikciós enzimmel emésztett pTPA103 plazmid DNS oldatához, 2,ul (~ 1000 egység) T4 DNS ligáz és 1,ul (~ 2 egység) T4 RNS ligázzal együtt, és a kapott ligálási reakciót 4°C -on éjszakán át inkubáljuk. A ligálással össze-

zárt DNS molekula a pTPA103derNdeI plazmid, amely lényegében azonos a pTPA103 plazmiddal, azzal a különbséggel, hogy a pTPA103derNdeI plazmidban egy NdeI restrikciós enzim felismerési hely van ott, ahol a pTPA103 plazmidban egy BglII restrikciós enzim felismerési hely van.

A ligált DNS-sel *E.coli* K12RV308 kompetens sejteket transzformálunk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A transzformált sejteket ampicillin-tartalmú L-agarlemezre szélesztjük és az *E.coli* K12RV308/pTPA103derNdeI transzformánsokat plazmid DNS-ük restrikciós enzim analízisével azonosítjuk. A pTPA103derNdeI plazmid DNS-t izoláljuk a transzformánsokból további felhasználás céljára, lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint.

Körülbelül 10 µg pTPA103derNdeI plazmid DNS 10 µl TE pufferben készült oldatát 2 µl 10x tömény AvaII reakció-puffer (0,6 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH=8,0, 0,1 M MgCl₂; 60 mM 2-merkapto-etanol és 1 mg/ml BSA) és 6 µl víz elegyéhez adjuk. Körülbelül 2 µl (~10 egység) AvaII restrikciós enzimet adunk a DNS oldathoz, és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az AvaII restrikciós enzimmel emésztett DNS-t agaróz gélre visszük, és addig elektrofore-

- 114 -

tirzáljuk, amíg a $\sim 1,4$ kb méretű restrikciós fragment elválik a többi restrikciós emésztési terméktől. A pTPA103der.NdeI plazmid $\sim 1,4$ kb méretű AvaII restrikciós fragmentjét izoláljuk a gélből; a kívánt fragmentből körülbelül $2\text{ }\mu\text{g}$ -ot kapunk, ezt $5\text{ }\mu\text{l}$ TE pufferben oldjuk.

Körülbelül $5\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ tömény Klenow puffert, $35\text{ }\mu\text{l}$ vizet és $5\text{ }\mu\text{l}$ (~ 5 egység) Klenow enzimet adunk a $\sim 1,4$ kb méretű AvaII restrikciós fragment oldatához és a kapott reakció-elegyet 16°C -on inkubáljuk 30 percig. A Klenow enzimmal kezelt DNS-t etanollal kicsapjuk, majd $3\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ tömény ligáz puffer és $14\text{ }\mu\text{l}$ víz elegyében oldjuk.

Körülbelül $2\text{ }\mu\text{g}$, következő szekvenciájú HpaI linkert:

```

5'-CGTTAACG-3'
  |||||
3'-GCAATTGC-5'

```

a 2. példában közölt eljárás szerint foszforilezzük. A foszforilezett linkerből körülbelül $10\text{ }\mu\text{l}$ -t adunk a pTPA103derNdeI plazmid Klenow-fragmenttel kezelt $\sim 1,4$ kb méretű AvaII restrikciós fragmentjéhez $2\text{ }\mu\text{l}$ (~ 1000 egység) T4 DNS ligázzal és $1\text{ }\mu\text{l}$ (~ 1 egység) T4 RNase ligázzal együtt és a kapott reakció-elegyet

éjszakán át 16 °C-on inkubáljuk.

A ligált DNS-t először egyszer fenollal extraháljuk, majd kétszer kloroformmal etanollal kicsapjuk, majd 2, μ l 10x EcoRI puffer és 16, μ l víz elegyében oldjuk. Körülbelül 2, μ l ($\sim$ 10 egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk a DNS oldathoz és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett DNS-t először egyszer extraháljuk fenollal, majd kétszer kloroformmal, etanollal kicsapjuk, majd 3, μ l 10x ligáz puffer és 20, μ l víz elegyében oldjuk. A körülbelül 770 bp méretű fragment, amely a trpPO-t és a TPA amino-terminális részét kódolja, egy EcoRI véggel és egy tompa véggel rendelkezik és az EcoRI-SmaI enzimekkel emésztett pUC19 plazmidba ligáljuk, így kapjuk a pUC19TPAFE plazmidot.

Körülbelül 2, μ l pUC19 plazmidot (kapható a Bethesda Research Laboratories-nál) oldunk 2, μ l 10x tömény SmaI pufferben (0,2 M KCl; 60 mM Tris-HCl, pH= 8,0; 60mM MgCl₂; 60 mM 2-merkaptó-etanol és 1 mg/ml BSA) valamint 16, μ l vízben. A DNS oldathoz körülbelül 2, μ l ($\sim$ 10 egység) SmaI restrikciós enzimet adunk és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 25 °C-on inkubáljuk. A SmaI restrikciós enzimmel emésztett pUC19 plazmid DNS-t

etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 2,ul 10x tömény EcoRI puffer és 16,ul víz elegyében oldjuk. A SmaI restriktációs enzimmel emésztett pUC19 plazmid DNS oldatához körülbelül 2,ul (~ 10 egység) EcoRI restriktációs enzimet adunk, majd a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37°C -on inkubáljuk. Az EcoRI-SmaI restriktációs enzimekkel emésztett pUC19 plazmid DNS-t egyszer fenollal extraháljuk majd utána kétszer kloroformmal és 5,ul TE pufferben oldjuk.

Az EcoRI-SmaI restriktációs enzimekkel emésztett pUC19 plazmid DNS-t hozzáadjuk a pTPA103derNdeI plazmidből származó ~ 770 bp méretű EcoRI és tompa véggel rendelkező restriktációs fragment oldatához. A DNS elegyhez körülbelül 2,ul (~ 1000 egység) T4 DNS ligázt adunk, és a kapott reakcióelegyet éjszakán át 16°C -on inkubáljuk. A ligált DNS-molekula a kívánt pUC19TPAFE plazmid. A pUC19TPAFE plazmid restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 9. ábrán közöljük.

A pUC19TPAFE plazmid készítésében felhasznált, EcoRI és SmaI felismerési szekvenciákat tartalmazó pUC19 többszörös klónozó hely a lacZ α fragment kódoló szekvenciájában található. Azokban a sejtekben, amelyek a lacZ Δ M15 mutációt, a β -galaktozidáz gént kódoló lacZ génben lévő mutációt tartalmaznak a lacZ α fragment

expressziója lehetővé teszi funkcionális β -galaktoszidáz molekula expresszióját és így lehetővé teszi, hogy a sejtek elhidrolizálják az X-Gal-t (5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktopiranozid), egy szintelen vegyületet, indigó színű hidrolizis terméké. A pUC19 többszörös klónozó helyére DNS-t beépítve a lacZ α fragment kódoló szekvenciája megszakad és az ilyen plazmidot tartalmazó, lacZ Δ M15 mutációval rendelkező sejtek nem képesek az X-Gal-t elhidrolizálni. A pUC19TPAFE plazmidot tartalmazó ligáló eleggyel kompetens E.coli K12RR1 Δ M15 (NRRL B-15440) sejteket transzformálunk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint.

A transzformált sejteket 100 μ g/ml ampicillint tartalmazó L-agarlemezre szélesztjük, amely emellett még 40 μ g/ml X-Gal-t és 1 mM IPTG-t is tartalmaz. A szintelen telepeket tovább tenyésztjük és plazmid DNS-t izolálunk belőle; az E.coli K12RR1 Δ M15/pUC19TPAFE transzformánsokat plazmid DNSük restrikciós enzimes analizisével azonosítjuk. A pUC19TPAFE plazmidot további felhasználás céljából izoláljuk az E.coli K12RR1 Δ M15/pUC19TPAFE sejtekből, lényegében az 1. példában leírt eljárást követve.

Körülbelül 7 μ g pUC19TPAFE plazmid 20 μ l TE pufferben készült oldatát 10 μ l 10x tömény HpaI reak-

ció-puffer (0,2 MKCl; 0,1 M Tris-HCl, pH=7,4 és 0,1 M MgCl₂) és 70,ul víz elegyéhez adjuk. Körülbelül 3,ul (≈6 egység) HpaI restriktációs enzimet adunk a pUC19TPAFE DNS-hez, és a kapott reakció-elegyet 20 percig 37 °C-on inkubáljuk. A rövid inkubációs idő célja az, hogy részleges HpaI emésztést érjünk el. A reakció-elegy térfogatát 1x tömény BamHI puffer (150 mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH=8,0 és 10 mM MgCl₂, a sókoncentráció emelése inaktiválja a HpaI restriktációs enzimet) hozzáadásával 150,ul-re emeljük. A HpaI restriktációs enzimmel részlegesen emésztett plazmid DNS oldatához körülbelül 1,ul (≈16 egység) BamHI restriktációs enzimet adunk, és a kapott reakció-elegyet 90 percig 37 °C-on inkubáljuk.

A BamHI restriktációs enzimmel teljesen, a HpaI restriktációs enzimmel részlegesen emésztett pUC19TPAFE plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, 1,5 %-os agaróz géltre visszük, és a ≈3,42 kb méretű HpaI-BamHI restriktációs fragmentet, amely a replikációs origót, a β-laktamáz gént és az összes TPA-kódoló részt tartalmazza a pUC19TPAFE plazmidból, izoláljuk a gélből a kívánt fragmentet tartalmazó gél darabot kivágva, megfagyasztva, majd a folyadékot kipréselve a gél darabból. A DNS-t etanollal kicsapjuk az oldatból. A kívánt fragmentből körülbelül 1,ug-ot kapunk, ezt 20,ul TE pufferben szuszpendáljuk.

Körülbelül 10,ug pTPA103 plazmid 10,ul TE pufferben készült oldatát 10,ul 10xScaI reakció-puffer (1,0 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH= 7.4; 60 mM MgCl₂, 10mM DTT és 1 mg/ml BSA) és 80,ul viz elegyében oldjuk. A pTPA103 plazmid DNS oldatához körülbelül 3,ul (≈18 egység) ScaI restrikciós enzimet adunk és a kapott reakció-elegyet 90 percig 37 °C-on inkubáljuk. A reakció-elegy térfogatát 150 ,ul-re állítjuk 1x tömény BamHI reakció-puffer hozzáadásával, ezután körülbelül 1,ul (≈16 egység) BamHI restrikciós enzimet adunk az elegyhez, és 90 percig 37 °C-on inkubáljuk. A DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd elektroforézishez előkészítve feloldjuk. A ScaI-BamHI restrikciós enzimekkel emésztett pTPA103 plazmid DNS-t 1,5 %-os agaróz gélre visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg a ≈1,015 kb méretű ScaI-BamHI restrikciós fragment elválik a többi restrikciós emésztési terméktől. A pTPA103 plazmid a TPA-karboxi-terminális részét kódoló ≈1,015 kb méretű ScaI-BamHI restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből; a kívánt fragmentből körülbelül 0,5 ,ug-t kapunk, ezt 20,ul üvegben desztillált vízben oldjuk.

A pUC19TPAFE plazmidból származó 3,42kb méretű BamHI-HpaI restrikciós fragment 2,ul-ét 2,ul,

- 120 -

a pTPA103 plazmidból származó $\sim 1,015$ kb méretű ScaI-BamHI restrikciós fragmenthez adjuk, majd $2\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ tömény ligáz puffert és $1\text{ }\mu\text{l}$ (~ 1 Weiss egység; a ligáz előállítója a Promega Biotec, 2700 S. Fish Hatchery Road, Madison, WI 53711) T4 DNS ligáz ^{adunk hozzá} és a kapott reakció-elegyet $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on éjszakán át inkubáljuk. Az összeligált DNS molekula a kívánt pBW25 plazmid. A pBW25 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 9. ábrán mutatjuk be.

A ligált DNS-t használjuk E.coli K12 JM105 törzse (kapható a BRL-nél) transzformálására, amelyet transzformációhoz kompetenssé lényegében a 3. példában leírt eljárással tettük, azzal a különbséggel, hogy az eljárásban 50 mM CaCl_2 -ot használunk. A transzformált sejteket $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicillint tartalmazó BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI) táptalajra szélesztjük, és az E.coli K12 JM105/pBW25 transzformánsokat plazmid DNS-ük restrikciós enzimes analizise alapján azonosítjuk. A további felhasználás céljára a pBW25 plazmidot lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint állítjuk elő.

C. A TPA kódoló régió helyspecifikus mutagenézise és a pBW28 plazmid előállítása

Körülbelül 5 μ g pBW25 plazmid 10 μ l üvegben desztillált vízzel készült oldatát adjuk körülbelül 10 μ l 10x tömény HindIII reakció-pufferhez és 80 μ l vízhez. A pBW25 plazmid DNS oldatához körülbelül 1 μ l ($\sim$ 20 egység) HindIII restrikciós enzimet adunk, és a kapott reakció-elegyet 90 percig 37 °C-on inkubáljuk. Körülbelül 3 μ l ($\sim$ 24 egység) EcoRI restrikciós enzimet és 10 μ l 1 mólos Tris-HCl (pH = 7,6) oldatot adunk a HindIII restrikciós enzimmel emésztett pBW25 plazmid DNS-hez és a kapott reakció-elegyet 90 percig inkubáljuk 37 °C-on. Az EcoRI-HindIII restrikciós enzimekkel emésztett pBW25 plazmidot etanolos kicsapással töményítjük, 1,5 %-os agaróz gélre visszük, majd addig elektroforetizáljuk, amíg a $\sim$ 810 bp méretű EcoRI-HindIII restrikciós fragment elválik a többi emésztési terméktől. A $\sim$ 810 bp méretű EcoRI-HindIII restrikciós fragmentből körülbelül 0,5 μ g-ot izolálunk a gélből, ligáláshoz előkészítjük és 20 μ l üvegben desztillált vízzel feloldjuk.

Az M13 mp8 DNS (kapható a New England Biolabs-tól) replikatív formájából körülbelül 4,5 μ g-ot 35 μ l üvegben desztillált vízzel oldunk, és 10 μ l 10x tö-

mény HindIII puffer és 55 μ l víz elegyében oldunk. Körülbelül 1 μ l ($\sim$ 20 egység) HindIII restrikciós enzimet adunk az M13 mp 8 DNS oldatához, majd a kapott reakció-elegyet 1 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Körülbelül 3 μ l ($\sim$ 24 egység) EcoRI restrikciós enzimet és körülbelül 10 μ l 1M Tris-HCl-t (pH = 7.6) adunk a HindIII restrikciós enzimmel emésztett M13 mp8 DNS-hez és a kapott reakció-elegyet egy órán át 37 °C-on inkubáljuk. A HindIII-EcoRI restrikciós enzimekkel emésztett M13 mp8 DNS-t etanolos kicsapással kinyerjük, feloldjuk gél-elektroforézishez és a restrikciós fragmentet gél-elektroforézissel izoláljuk. Körülbelül 1 μ g-ot kapunk a M13 mp8 nagy EcoRI-HindIII restrikciós fragmentjéből, majd 20 μ l üvegben desztillált vízben oldjuk. Az M13 mp8-ból származó nagy EcoRI-HindIII restrikciós fragmentből 2 μ l-t, 2 μ l 10x tömény ligáz puffert, 12 μ l vizet és 1 μ l ($\sim$ 1 Weiss egység) T4 DNS ligázt adunk 3 μ l, a pBW25 plazmidből származó $\sim$ 810bp méretű EcoRI-HindIII restrikciós fragmenthez, és a kapott ligálási reakciót éjszakán át 16 °C-on inkubáljuk.

E.coli JM103 sejteket (a BRL-től vásárolható) teszünk kompetenssé és transzformálunk a ligáló eleggyel, lényegében a BRL M13 Cloning/Dideoxy Sequencing Instruction Manual-ban leírtak szerint, azzal a különb-

séggel, hogy a transzfekcióhoz használt DNS mennyisége változó volt. A rekombináns tarfoltokat a β -galaktoridáz α -fragmentjét kódoló gén inszerciós inaktiválódása alapján azonosítjuk, ami abban nyilvánul meg, hogy a sejteknek megszűnt az X-gal-t hasító képessége, így szintelenek maradnak. Screening céljára hat fehér tarfoltot oltunk át 2,5 ml L táptalajba, amihez 0,4 ml E.coli K12 JM103 sejtsuszpenziót adunk, amelyet minimál táptalajon állítunk elő, hogy a törzsek ne veszítsék el a logaritmikus fázisban a proAB-t hordozó F episzómát. A tarfolt tartalmu oldatokat 8 órán át inkubáljuk 37 °C-on levegőztetett rázógépen. 1,5 ml-es alkvot részekből centrifugálás után RF DNS-t izolálunk, lényegében a lugos mini-screen eljárásalapján [Birnbom and Doly, Nuc. Acids Res. 7, 1513 (1979)]. Minden egyes tenyészet maradékát 4 °C-on tároljuk. A kívánt pM8BW26 jelű fág tartalmazza a pBW plazmid 810 bp méretű EcoRI-HindIII restrikciós fragmentjét az M13mp8 fág ~ 7,2 kb EcoRI-HindIII restrikciós fragmentjéhez ligálva.

Körülbelül ötven ml logfázisú E.coli JM103 sejtet fertőzünk pM8BW26-tal és 18 órán át 37 °C-on inkubáljuk egy levegőztetett rázóberendezésben. A fertőzött sejteket kis-sebességű centrifugálással kiülepítjük, majd egyezálu pM8BW26 plazmid DNS-t izolálunk a tenyészet felüluszójából, az Instruction manual-ban meg-

adott eljárást felnagyítva. Az egyszáлу pM8BW26 fágot mutagenizáljuk lényegében Adelman és munkatársai leírása alapján [DNA, 2 (3), 183-193 (1983)]¹, azzal a különbséggel, hogy a Klenow reakciót szobahőmérsékleten végezzük 30 percig, majd 37 °C-on 60 percig, utána 10 °C-on 18 órán át. Ezután az S1 nukleázos kezelést 20 °C-on végezzük, a puffer sókoncentrációja fele annak amit az előállító javasol, és az M13 szekvenáló primert (BRL) használjuk. A szintetikus oligodezoxinukleotid primer, amelynek használatával a nativ TPA 87-es és 261-es aminosava közötti részt kivágjuk, a következő összetételű:

5'-GGGAAGTGCTGTGAAATATCCACCTGCGGCCTGAGA-3'.

A kapott mutagenézis keveréket használjuk E.coli K12JM103 transzfektálására, lényegében az előbb ismertetett fertőzési eljárás szerint. A kívánt mutánsokat az RF DNS restrikciós enzimes analízisével és Maxam-Gilbert féle szekvenálással azonosítjuk. A kívánt mutánst, amelyből a nativ TPA 87-261-es aminosavait kódoló szekvenciát kivágtuk, pM8BW27 jelzéssel látjuk el.

A pBW28 plazmid előállításához számos DNS fragmentre van szükségünk. Ezek közül a fragmentek közül az elsőt úgy állítjuk elő, hogy körülbelül 20 µg

RF pM8BW27 DNS 20, μ l üvegkészülékben desztillált vízzel készült oldatát 60, μ l vízhez és 10, μ l 10x tömény NdeI reakció-pufferhez adjuk. Körülbelül 10, μ l ($\sim$ 50 egység) NdeI restrikciós enzimet adunk a pM8BW27 plazmid DNS-oldatához és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az NdeI restrikciós enzimmel emésztett pM8BW27 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 10, μ l 10x tömény EcoRI puffer és 90, μ l víz elegyében oldjuk. Az NdeI restrikciós enzimmel emésztett pM8BW27 plazmid DNS-hez EcoRI restrikciós enzimet adunk, majd a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az EcoRI-NdeI restrikciós enzimekkel emésztett pM8BW27 plazmid DNS-t agaróz gélen elektroforetizáljuk, amíg a deléciót tartalmazó TPA kódoló szekvenciát tartalmazó $\sim$ 560 bp méretű NdeI-EcoRI restrikciós fragment el nem válik a többi emésztési terméktől. Az 560 bp méretű NdeI-EcoRI restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből; a kívánt fragmentből kapott körülbelül 0,5 μ g-ot 20, μ l üvegkészülékben desztillált vízzel oldjuk.

A pBW28 plazmid előállításához szükséges második fragmentet automata DNS szintetizátorral állítjuk elő, egy-egy láncot megszintetizálva egyszerre. A két komplementer láncot, amelyek hibridizálva képeznek egy XbaI és NdeI átfedést, a 2. példában leírt eljárás szerint foszforilezzük és illesztjük egymáshoz. A linker

szerkezete a következő:

XbaI

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAACA-3'

TCCATAATTATTACATAGCTAAATTTATTCCTCCTTATTGTAT
NdeI

A pBW28 plazmid előállításához szükséges harmadik fragmentet úgy állítjuk elő, hogy ~ 20 μ g pTPA103 plazmid 20 μ l TE pufferben készült oldatát 10 μ l $10\times$ tömény BamHI puffer és 60 μ l víz elegyéhez adjuk. Körülbelül 10 μ l (~ 50 egység) BamHI restrikciós enzimet adunk a pTPA103 plazmid DNS oldatához és a kapott reakció-elegyet két órán át 37°C -on inkubáljuk. A BamHI restrikciós enzimmel emésztett pTPA103 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 10 μ l $10\times$ tömény EcoRI puffer és 80 μ l víz elegyében oldjuk. A BamHI restrikciós enzimmel emésztett pTPA103 plazmid DNS oldatához körülbelül 10 μ l (~ 50 egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk, és a kapott reakció-elegyet két órán át 37°C -on inkubáljuk. A BamHI-EcoRI restrikciós enzimekkel emésztett pTPA103 plazmid DNS-t agaróz-gélra viesszük, majd addig elektroforetizáljuk, amíg a ~ 689 bp méretű EcoRI-BamHI restrikciós fragment, amely a TPA karboxi-terminális

részét tartalmazza, elválik a többi emésztési terméktől. A gélből körülbelül 0,5 μ g $\sim$ 689 bp méretű fragmentet izolálunk, majd 10 μ l üvegkészülékben desztillált vízzel oldjuk.

A pBW28 plazmid előállításához szükséges utolsó fragmentet a pL110 plazmidból izoláljuk, amelynek előállítását a 9. példában írjuk le. Körülbelül 25 μ g pL110 plazmid DNS 25 μ l TE pufferben készült oldatát 10 μ l 10x tömény XbaI reakció-puffer (0,5 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH = 7.9; 60 mM MgCl₂ és 1 mg/ml BSA) és 55 μ l víz elegyében oldjuk. A pL110 plazmid DNS oldatához körülbelül 10 μ l ($\sim$ 50 egység) XbaI restrikciós enzimet adunk és a kapott reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az XbaI restrikciós enzimmel emésztett pL110 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 10 μ l 10x tömény BamHI puffer és 89 μ l víz elegyében oldjuk. Körülbelül 1 μ l ($\sim$ 5 egység) BamHI restrikciós enzimet adunk az XbaI restrikciós enzimmel emésztett pL110 plazmid DNS-hez, és a kapott reakció-elegyet 30 percig 37 °C-on inkubáljuk, hogy részleges BamHI emésztést kapjunk. Az XbaI restrikciós enzimmel teljesen, BamHI restrikciós enzimmel részlegesen emésztett pL110 plazmid DNS-t agaróz gélre visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg a 6,0 kb méretű XbaI-BamHI

fragment tisztán elválik a többi emésztési terméktől. A $\sim 6,0$ kb méretű restriktációs fragmentet izoláljuk a gélből; a $\sim 6,0$ kb méretű XbaI-BamHI restriktációs fragmentből körülbelül $0,5 \mu\text{g}$ -ot kapunk, ezt $40 \mu\text{l}$, üvegkészülékben desztillált vízzel oldjuk. Ez a ~ 60 kb méretű XbaI-BamHI restriktációs fragment az EK-BGH kódoló rész kivételével a teljes pL110 plazmidot tartalmazza.

A pBW28 plazmid előállításához a következő fragmenteket keverjük össze: körülbelül $0,1 \mu\text{g}$ ($\sim 8 \mu\text{l}$)

$6,0$ kb méretű BamHI-XbaI restriktációs fragment a pL110 plazmidból; körülbelül $0,05 \mu\text{g}$ ($\sim 2 \mu\text{l}$) ~ 560 bp méretű NdeI-EcoRI restriktációs fragment a pM8BW27 plazmidból; körülbelül $0,1 \mu\text{g}$ ($\sim 2 \mu\text{l}$) ~ 689 bp méretű EcoRI-BamHI restriktációs fragment a pTPA103 plazmidból; és körülbelül $0,02 \mu\text{g}$ ($\sim 1 \mu\text{l}$) a ~ 45 bp méretű XbaI-NdeI szintetikus linkerből. Körülbelül $2 \mu\text{l}$ $10\times$ tömény ligáz puffert és $1 \mu\text{l}$ (~ 1 Weiss egység) T4 DNS ligázt adunk a DNS keverékhez, majd a kapott ligálási reakciót 4°C -on éjszakán át inkubáljuk. Az összeligált DNS molekula a kívánt pBW28 plazmid. A pBW28 plazmid restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 10. ábrán mutatjuk be.

A ligált DNS-t kompetens *E. coli* K12MM294 (NRRL B-15625) törzse transzformálására használjuk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint, azzal a különb-

séggel, hogy az eljárás során 50 mM CaCl_2 -t használunk. Mivel a pBW28 plazmidon megtalálható a lambda pL promotor és a hőmérséklet-érzékeny lambda pL represszort kódoló gén, a transzformációs eljárás és a transzformánsok tenyésztése némileg eltérő. A transzformáció és az ezt követő tenyésztés során a sejteket nem tesszük ki 32 °C-nál magasabb hőmérsékletnek. A kivánt E.coli K12 MM294/pBW28 transzformánsokat tetraciklin-rezisztens, ampicillin érzékeny fenotípusuk és plazmid DNS-ük restrikciós enzimes analízise alapján azonosítjuk.

D. A pBW32 plazmid előállítása

Körülbelül 10 µg pSV2-β-globin plazmid DNS-t (NRRL B-15928) oldunk 10 µl 10x tömény HindIII reakció-puffer, 5 µl (~50 egység) HindIII restrikciós enzim és 85 µl víz összetételű oldatban, majd a reakció-elegyet 2 órára 37 °C-ra tesszük. A reakció-elegybe annyi LiCl-ot teszünk, hogy koncentrációja 0,15 M legyen, majd 2,5 térfogat etanol hozzáadása és etanol-szárazjég fürdőben való inkubálás után a DNS-t centrifugálással ülepitjük.

A DNS csapadékot 10 µl 10x tömény BglII reakció-puffer, 5 µl (~50 egység) BglII restrikciós enzim és 85 µl víz elegyében oldjuk, majd a reakció-

-elegyet két órára 37 °C-ra tesszük. A BglIII restrikciós enzimmel végzett emésztés után a reakció-elegyet 0,85 %-os agaróz gélre visszük, és a fragmenteket elektroforézissel szétválasztjuk. A gél-ben lévő DNS-t etidium-bromiddal és ultraibolya fénnel láthatóvá tesszük, és a ~4,2 kb méretű HindIII-BglIII restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből az előzőekben leírtak szerint. Körülbelül 5 µg keletkezik a kívánt ~4,2 kb méretű HindIII-BglIII restrikciós fragmentből, ezt 10 µl vízben oldjuk. A TPA-t kódoló pTPA103 plazmid ~2 kb méretű HindIII-BamHI restrikciós fragmentjét izoláljuk, lényegében az előzőek szerint. A pTPA102 plazmidból körülbelül 5 µg ~2,0 kb méretű HindIII-BamHI restrikciós fragmentet kapunk, ezt 10 µl vízben oldjuk, majd -20 °C-on tároljuk.

A pSV2-β-globin plazmid ~4,2 kb méretű BglIII-HindIII restrikciós fragmentjéből 2 µl- és a pTPA103 ~2,0 kb méretű HindIII-BamHI fragmentjéből 4 µl-t összekeverünk, majd 2 µl 10x tömény ligáz puffer 11 µl víz és 1 µl T4 DNS ligáz (~500 egység) elegyében 4 °C-on éjszakán át inkubáljuk. Az összeligált DNS molekula a kívánt pTPA301 plazmid. A ligált DNS-sel kompetens E.coli K12RR1 sejteket (NRRL B-15210) transzformálunk, lényegében a 3. példában leírt eljárás sze-

rint. A plazmid DNS-t kinyerjük az E.coli K12 RR1/pTPA301 transzformánsokból az 1. példában leírt eljárást alkalmazva. A pTPA301 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 10. ábrán közöljük.

A pSV2-dhfr plazmid tartalmazza a dihidrofolát reduktáz (dhfr) gént, amely alkalmas transzformált eukarióta sejtek transzformálására, valamint a dhfr génhez kovalensen kapcsolt DNS amplifikálására. Tíz mikrogram pSV2-dhfr plazmidot (E.coli K12HB101/pSV2-dhfr, ATCC 37146 törzsből izolálva) elegyítünk 10 µl 10x tömény PvuII pufferrel, 2 µl (≈20 egység) PvuII restrikciós enzimmel valamint 88 µl vízzel és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. A reakciót fenol és kloroform extrakcióval leállítjuk, majd a PvuII restrikciós enzimmel emésztett pSV2-dhfr plazmid DNS-t kicsapjuk és centrifugálással kinyerjük.

BamHI linkert (5'-CGGATCCCG-3') foszforilezünk és készítünk elő ligáláshoz a következő eljárás szerint. 1 µg linker 5 µl vizes oldatához a következőket adjuk: 10 µl 5x tömény kináz sóoldat (300 mM Tris-HCl, pH= 7,8; 5 mM MgCl₂ és 25 mM DTT), 5 µl 5 mM ATP, 5 µl BSA (1 mg/ml), 5 µl 10 mM spermidin,

19 μ l víz és 1 μ l polinukleotid kináz (10 egység/ μ l). Ezt a reakció-elegyet 60 percig 37 °C-on inkubáljuk, majd -20 °C-on tároljuk. A PvuII restrikciós enzimmel emésztett pSV2-dhfr plazmidból öt μ l-t ($\sim$ 5 μ g) és 12 μ l ($\sim$ 0,25 μ g) foszforilezett BamHI linkert összekeverünk, majd 11 μ l ($\sim$ 1000 egység) T4 DNS ligáz elegyében éjszakán át 16 °C-on inkubáljuk.

Tíz μ l 10x tömény BamHI reakció-puffert 10 μ l ($\sim$ 50 egység) BamHI restrikciós enzimet és 48 μ l vizet adunk a ligáló elegyhez, amit ezután 3 órán át 37 °C-on inkubálunk. A reakció-elegyet 1 %-os agaróz gélre visszük, majd a kívánt 1,9 kb méretű fragmentet, amely a dhfr gént tartalmazza, izoláljuk a gélből. Az ezekben a példákban végrehajtott összes linker-kapcsolást agaróz gélen rutinszerűen tisztítjuk, hogy csökkentjük a többszörös linker szekvenciák előfordulásának valószínűségét végső vektorban. A $\sim$ 3 μ g izolált fragmentet 10 μ l TE pufferben oldjuk.

Ezután körülbelül 15 μ l ($\sim$ 1 μ g) pTPA plazmid DNS-t BamHI restrikciós enzimmel emésztjük a fentiek szerint. Mivel egyetlen BamHI hasítási hely van a pTPA301 plazmidon, ezért a BamHI restrikciós enzimmel végzett emésztés lineáris pTPA301 plazmid DNS-t eredményez. A BamHI restrikciós enzimmel emésztett pTPA301 plazmidot

etanollal kicsapjuk és 94, μ l vízben szuszpendáljuk, hozzáadunk 5, μ l 1M Tris-HCl-t, pH = 9,0; és 1, μ l borjubél alkalikus foszfatázzal (Collaborative Research, Inc., 128 Spring Street, Lexington, MA 02173) foszfatázozzuk 65 °C-on 45 percig. A DNS-t fenol kloroform eleggyel extraháljuk, majd kloroform:izoamil-alkohol eleggyel, etanollal kicsapjuk, majd 20, μ l vízben oldjuk. Tíz, μ l ($\sim$ 0,25 μ g) foszfatázozott pTPA301 plazmidot adunk 5, μ l ($\sim$ 1,5 μ g) dhfr gént tartalmazó BamHI restrikciós fragmenthez, 3, μ l 10x tömény ligáz pufferhez, 3, μ l ($\sim$ 1500 egység) T4 DNS ligázhoz és 9, μ l vízhez. Ezt a ligáló elegyet 15 °C-on éjszakán át inkubáljuk; a ligált DNS a kívánt pTPA303 plazmid DNS.

A pTPA303 plazmiddal E.coli K12RR1 (NRRL B-15210) sejteket transzformálunk, és a kapott E.coli K12 RR1/pTPA303 transzformánsokat ampicillin-rezisztens fenotípusuk és plazmid DNS-ük restrikciós enzimese analízise alapján azonosítjuk. A pTPA303 plazmidot a transzformánsokból lényegében az 1. példában leírt eljárással izoláljuk. A pTPA303 plazmid plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 10. ábrán mutatjuk be.

Hogy a pTPA301 plazmidból izoláljuk azt a 2,7 kb méretű EcoRI-BglII restrikciós fragmentet, amely a pBR322 replikációs origót és a β -laktamáz gént

kódoló szekvenciát tartalmazza, körülbelül 10 µg pTPA301 plazmid DNS-t emésztünk 400 µl össztérfogatban 20 egység BglII restrikciós enzimmel 1x tömény BglII pufferben 37 °C-on. A BglII restrikciós enzimmel végzett emésztés után a Tris-HCl koncentrációját 110 mM-ra állítjuk, majd a BglII restrikciós enzimmel emésztett DNS-hez 20 egység EcoRI restrikciós enzimet adunk. Ezt a reakció-elegyet 2 órán át 37 °C-on inkubáljuk. Az EcoRI-BglII restrikciós enzimmel emésztett DNS-t agaróz géltre visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg a ~2,7 kb méretű EcoRI-BglII restrikciós fragment elválik a többi emésztési terméktől, majd a ~2,7 kb méretű fragmentet izoláljuk és ligáláshoz előkészítjük.

A dhfr gént tartalmazó restrikciós fragment izolálásához a pTPA303 plazmidot HindIII és EcoRI restrikciós enzimekkel emésztjük és a ~2340 bp méretű fragmentet, amely a dhfr gént tartalmazza, izoláljuk és kinyerjük.

Hogy a pTPA303 plazmidból a TPA karboxi-terminális részét és a SV40 promotert tartalmazó ~2 kb méretű HindIII és SstI restrikciós fragmentet izoláljuk, a pTPA303 plazmidot egyszerre emésztjük HindIII és SstI restrikciós enzimmel 1x tömény HindIII pufferben. Az ~1,7 kb méretű fragmentet izoláljuk a gélből és ligáláshoz előkészítjük.

Hogy a pBW29 plazmidból izoláljuk a módosított TPA amino-terminális részét kódoló ~ 680 bp méretű XhoII (összeligálható a BglIII véggel)-SstI restrikciós fragmentet, körülbelül $10 \mu\text{g}$ pBW28 plazmid DNS-t emésztünk XhoII enzimmel $1\times$ tömény XhoII pufferben ($0,1$ M Tris-HCl, $\text{pH} = 8,0$; $0,1$ M MgCl_2 ; $0,1\%$ Triton X-100 és 1 mg/ml BSA). Az XhoII restrikciós enzimmel emésztett DNS-t etanollal kicsapjuk, majd SstI enzimmel megemésztjük. Az XhoII-SstI restrikciós enzimekkel emésztett DNS-t akrilamidra visszük és a kívánt fragmentet izoláljuk a gélből, majd ligáláshoz előkészítjük.

A fenti fragmentekből: a pTPA301 plazmid $\sim 2,7$ kb méretű EcoRI-BglIII restrikciós fragmentje, a pTPA303 plazmid $\sim 2,34$ kb méretű EcoRI-HindIII restrikciós fragmentje, a pTPA303 plazmid $\sim 1,7$ kb méretű SstI-HindIII restrikciós fragmentje és a pBW28 $\sim 0,68$ kb méretű SstI-ShoII restrikciós fragmentje, mindegyikből körülbelül $0,1-0,1 \mu\text{g}$ -ot keverünk össze, majd ezeket összeligálva kapjuk a pBW32 plazmidot. A ligáló elegyet használjuk E.coli K12 MM294 törzstranszformálására a 3. példa szerint, azzal a különbséggel, hogy az eljárásban $50 \mu\text{M}$ CaCl_2 -ot használunk. A transzformánsokat ampicillin rezisztens fenotípusuk és plazmid DNS-ük analízise alapján azo-

nosítjuk. A pBW32 plazmid DNS-t az E.coli K12 MM294/ pBW32 transzformánsokból állítjuk elő, lényegében az 1. példában közölt eljárás szerint. A pBW32 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 10. ábrán közöljük.

17. példa

A pLPChd1 és pLPChd2 plazmidok előállítása

Körülbelül 20, μ g pBW32 plazmid 20, μ l TE-ben készült oldatát 10, μ l 10x tömény BamHI pufferhez és 60, μ l vízhez adjuk. Körülbelül 10, μ l ($\sim$ 50 egység) BamHI restrikciós enzim^{adunk}et a pBW32 plazmid oldatához, és a kapott reakció-elegyet két órán át 37 °C-on inkubáljuk. A BamHI restrikciós enzimmel emésztett pBW32 plazmid DNS-t etanollal kicsapjuk, centrifugálással kinyerjük, majd 5, μ l 10x tömény Klenow puffer, 45, μ l víz és 2, μ l ($\sim$ 1000 egység) Klenow enzim oldatában oldjuk. A reakció-elegyet 30 percig 16 °C-on inkubáljuk, a reakció-elegyet agaróz gélre visszük, majd addig elektroforetizáljuk, amíg az emésztési termékek teljesen szétválnak. A dhfr gént tartalmazó $\sim$ 1,9 kb méretű, Klenow fragmenttel kezelt BamHI restrikciós fragmentet izoláljuk a gélből és ligáláshoz előkészítjük a 12A. példában leírt eljárás alapján. A kívánt fragmentből körülbelül

4,ug-öt kapunk, ezt 5,ul TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 200,ug pLPChyg1 plazmid 100,ul TEpufferes oldatát 15,ul 10x tömény EcoRI pufferhez és 30,ul vízhez adjuk. Körülbelül 5,ul ($\sqrt{50}$ egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk a pLPC hyg1 plazmid DNS oldatához, és a kapott reakcióelegyet körülbelül 10 percig 37 °C-on inkubáljuk. A rövid reakció-idő célja, hogy részleges EcoRI emésztést kapjunk. A pLPChyg1 plazmidban két EcoRI restrikciós enzim felismerési hely van, az egyik a higromicin rezisztenciát (HmR) kódoló szekvenciában, és az a cél, hogy a dhfr gént tartalmazó restrikciós fragmentet a pLPChyg1 plazmidnak abba a restrikciós helyébe illesszük be, amely nincs a HmR génben. Az EcoRI enzimmel részlegesen emésztett pLPChyg1 plazmid DNS-t agaróz gélre visszük, és addig elektroforetizáljuk, amíg az egyszer hasított pLPChyg 1 plazmid DNS elválik az érintetlen plazmidtól, valamint a többi emésztési terméktől. A lineáris (egyszer hasított) DNS-t izoláljuk a gélből és ligáláshoz előkészítjük, lényegében a 12A. példában leírt eljárás szerint. Az EcoRI enzimmel egyszeresen hasított pLPChyg 1 plazmidból körülbelül 2,ug-ot izolálunk, majd 25,ul TE pufferben oldjuk. Ehhez az oldathoz körülbelül 5,ul ($\sqrt{25}$ egység) Klenow enzimet, 5,ul 10x tömény Klenow puffert és 40,ul vizet adunk, majd a kapott

reakció-elegyet 60 percig inkubáljuk 16°C -on. A Klenow enzimmel kezelt, EcoRI enzimmel részlegesen emésztett DNS-t kétszer fennállal extraháljuk majd egyszer kloroformmal, utána etanollal kicsapjuk és 25 μl TE pufferben oldjuk.

A pBW plazmid $\sim 1,9$ kb méretű, Klenow fragmenttel kezelt BamHI restrikciós fragmentjéből körülbelül 5 μl -t és az EcoRI restrikciós enzimmel egyszeresen hasított pLPChyg1 DNS-ből körülbelül 5 μl -t összekeverünk, majd a DNS oldathoz 1 μl 10x tömény ligáz puffert, 5 μl vizet, 1 μl (~ 500 egység) T4 DNS ligázt és 1 μl (~ 2 egység) T4 RNS ligázt adunk, és a kapott reakció-elegyet éjszakán át 16°C -on inkubáljuk. Az összeligált DNS molekulák a pLPChd1 és pLPChd2 plazmidok, amelyek csak a 1,9 kb méretű, a dhfr gént tartalmazó fragment orientációjában különböznek.

A ligált DNS-t használjuk kompoetens *E. coli* K12HB101 sejtek transzformálására, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A transzformált sejteket 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillint tartalmazó L-agarra szélesztjük, és az ampicillin rezisztens transzformánsok plazmid DNS-eit vizsgáljuk restrikciós enzimes analízissel, hogy az *E. coli* K12HB101/pLPChd1 és az *E. coli* K12HB101/pLPChd2 transzformánsokat azonosítsuk. A jelen leírásban a pLPChd1

plazmid a pLPChd jelölést kapta. A pLPChdplac plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 11. ábrán mutatjuk be. A pLPChd1 és pLPChd2 plazmid DNS-eket a megfelelő transzformánsokból izoláljuk, lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint.

18. példa

A phd plazmid előállítása

A phd plazmid előállításához a kiindulási anyagként szolgáló pLPChd1 plazmid DNS-t olyan E.coli gazdasejtből kell izolálni, amelyből hiányzik az adenin metiláz, amit például a dam gén kódol, amelynek a terméke az 5'-GATC-3' szekvenciában lévő adenin csoportot metilezi. Az E.coli K12GM48 (NRRL B-15725) törzsben nincs működőképes metiláz, ezért ez megfelelő gazdaszervet a phd plazmid előállításában kiindulási anyagként használt pLPChd1 plazmid DNS előállításához.

Az E.coli K12GM48 sejtek tenyésztését és transzformációra kompetenssé tételét, valamint az E.coli K12GM48 sejtek pLPChyg1 plazmiddal való transzformálását a 3. példában leírt eljárás szerint végezzük. A transzformált sejteket ampicillint tartalmazó L agarra szeljesztjük, és az ampicillin rezisztens E.coli K12GM48/pLPChd1 transzformáns telepek közül egyet kiválasztunk a

pLPChd1 plazmid DNS előállításához, az 1. példában leírt eljárás szerint. Körülbelül 1 mg pLPChd1 plazmid DNS-t izolálunk, majd körülbelül 1 ml TEpufferben oldjuk.

Körülbelül 2 µg pLPChd1 plazmid DNS 2 µl TE pufferes oldatát 2 µl 10x tömény BclI puffer (750 mM KCl; 60 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 100 mM MgCl₂; 10 mM DTT és 1 mg/ml BSA) és 14 µl víz elegyéhez adjuk. A pLPChd1 plazmid DNS oldatához körülbelül 2 µl (≈10 egység) BclI restrikciós enzimet adunk, majd a kapott reakció-elegyet két órán át 50 °C-on inkubáljuk. A reakciót úgy állítjuk le, hogy az elegyet egyszer fenollal, majd kétszer kloroformmal extraháljuk.

A BclI restrikciós enzimmel emésztett pLPChd1 plazmid DNS-ből körülbelül 1 µl-t adunk 1 µl 10x tömény ligáz puffer, 8 µl víz és 1 µl (≈500 egység) T4 DNS ligáz elegyéhez. A ligáló reakció-elegyet éjszakán át 16 °C-on inkubáljuk, az összeligált DNS molekula a kívánt phd plazmid. A phd plazmid úgy keletkezik, hogy a pLPcat plazmid készítése során bevitt extra BclI linkereket kivágjuk, valamint a pLPChd1-ben lévő két szomszédos BclI restrikciós felismerési hely által határolt ≈1,45 kb méretű fragmentet. A phd plazmid restrikciós

és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, a 11. ábrán mutatjuk be. A phd plazmid megkönnyíti a jelen szabadalom szerinti BK virus erősítő szekvencia-adenovirus késői promoterről bármely DNS szekvencia expresszióját, mivel az expresszálandó DNS-t könnyen be lehet illeszteni az expresszióhoz megfelelő helyzetben a phd plazmid egyetlen BclI helyére.

A ligált DNS-t használjuk az E.coli K12GM48 törzs transzformálására, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A transzformált sejteket ampicillin-tartalmu L agarra szélesztjük, és az ampicillin-rezisztencia E.coli K12GM48/phd transzformánsokat plazmidjuk restrikciós enzimes analízise alapján azonosítjuk.

19. példa

A pL-KSL plazmid készítése

A pGKC2310 plazmid KS1/4 rágcsáló monoklonális antitest könnyű láncát kódoló teljes hosszúságú cDNS-t tartalmazza. Az E.coli K12MM294/pGKC2310 törzs NRRL B-18356 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratory-nál. A pGKC2310 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 12. ábrán mutatjuk be. A tenyészetből a plazmid DNS-t

lényegében az 1. példában közölt eljárással állíthatjuk elő, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37 °C.

A pGKC2310 plazmidből körülbelül 5 μ g-ot emésztünk EcoRI restrikciós enzimmel, lényegében a 8. példa szerint, ezután Klenow fragmenttel kezeljük az 5. példában leírt eljárás szerint. Ezután BamHI linkeket (New England Biolabs) adunk a DNS fragmentekhez, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint. A DNS-t végül agaróz gélen elektroforetizáljuk majd tisztítjuk a 12. példában leírt eljárás szerint. A kívánt $\sim$ 1,1 kb méretű fragmentet etanollal kicsapjuk, majd 5 μ l TE-ben oldjuk.

Körülbelül 1 μ g phd plazmid DNS-t emésztünk BclI restrikciós enzimmel, lényegében a 18. példában leírt eljárás szerint, majd a 12. példában leírt eljárás szerint elektroforetizáljuk és tisztítjuk. A pGKC2310 plazmid EcoRI restrikciós enzimmel emésztett, Klenow fragmenttel kezelt, linkerrel módosított $\sim$ 1,1 kb méretű DNS fragmentet a BclI restrikciós enzimmel kezelt phd plazmidba ligáljuk, lényegében a 2. példa szerinti eljárás alapján. Ezzel a ligáló eleggyel E.coli sejteket transzformálunk lényegében a 3. példában szereplő eljárással. A plazmidot ezután az 1. példában szereplő eljárás szerint izoláljuk a sejtekből, majd a

helyes orientációju plazmidnak a pL-KSL jelölés adjuk.

20. példa

A pH-KS plazmid előállítása

A pG2A52 plazmid a KS1/4 rágcsló monoklonális antitest nehéz láncát kódoló teljes hosszúságú cDNS-t tartalmaz. Az E.coli K12MM294/pG2A52 törzset NRRL B-18357 sorszám alatt a Northern Research Laboratory-tól lehet beszerezni. A pG2A52 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, a 12. ábrán mutatjuk be. A plazmid DNS-t a tenyészetből lényegében az 1. példában közölt eljárással izoláljuk, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37 °C.

Körülbelül 5 μ g pG2A52 plazmid DNS-t emésztünk EcoRI restrikciós enzimmel lényegében a 8. példában közölt eljárással, majd Klenow enzimmel kezeljük, az 5. példában közölt eljárás alapján. Ezután BamHI linkereket (New England Biolabs) adunk a DNS fragmenthez, a 2. példában közölt eljárás alapján. A DNS-t végül agaróz gélen elektroforetizáljuk, majd a 12. példában közölt eljárás szerint tisztítjuk. A kívánt ~1,6 kb méretű fragmentet etanollal kicsapjuk, majd 5 μ l TE pufferben oldjuk.

Körülbelül 1 μ g phd plazmidot emésztünk BclI restrikciós enzimmel a 18. példában közölt eljárás

szerint, majd a 12. példában közölt eljárás szerint elektroforetizáljuk és tisztítjuk. A pG2A52 plazmid $\sim 1,6$ kb méretű, EcoRI restriktációs enzimmel emésztett, Klenow enzimmel kezelt, linkerrel módosított DNS fragmentjét ezután BclI restriktációs enzimmel emésztett phd plazmidba ligáljuk, lényegében a 2. példában közölt eljárás szerint. A ligáló elegyet ezután E.coli sejtekbe transzformáljuk, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A plazmidot ezután az 1. példában közölt eljárással izoláljuk a sejtekből és a megfelelő orientációval rendelkező plazmidnak a pH-KS jelölést adjuk.

21. példa

A pL-HD plazmid előállítása

A pCHKC2-18 plazmid egy humán könnyű lánc konstans régióját kódoló genomiális DNS fragmenthez kapcsolva tartalmazza a KS1/4 rágcsáló monoklonális antitest könnyű láncának variábilis régióját kódoló cDNS fragmentet. A pCHKC2-18 plazmid által kódolt variábilis régió egyetlen aminosav eltérést tartalmaz a természetben előforduló KS1/4 monoklonális antitest variábilis régiójához képest. A vad-típusu variábilis régióban a karboxi-terminális aminosav egy arginincsoport, míg a pCHKC2-18 plazmid által kódolt fehérjében ez a csoport

egy glicin csoport. Az E.coli K12DH5/pCHKC2-18 törzs NRRL B-18359 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratory-nál. A pCHKC2-18 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 13. ábrán közöljük. A plazmid DNS-t lényegében az 1. példában leírt eljárással izoláljuk a tenyészetből, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37°C .

Körülbelül $5\text{ }\mu\text{g}$ pCHKC2-18 plazmidot emésztünk lényegében a 8. példában leírt szerint, azzal a különbséggel, hogy FnuDII restrikciós enzimet és 10x tömény FnuDII reakció-puffert (60 mM NaCl, 60 mM Tris-HCl (pH 7,4) és 60 mM MgCl_2) használunk. A DNS-t ezután HindIII restrikciós enzim és 10x tömény HindIII reakció-puffer (500 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl (pH 8,0) és 100 mM MgCl_2) felhasználásával emésztjük, majd a $\sim 1,3$ kb méretű FnuDII-HindIII fragmentet izoláljuk, agaróz gélből, lényegében a 12. példában leírt eljárás szerint. Etanolos kicsapás, majd feloldás után az 5' tulnyuló végét a HindIII helynek Klenow fragmentet használva feltöltjük, lényegében az 5. példában közölt eljárás szerint.

Körülbelül $0,5\text{ }\mu\text{g}$ BclI restrikciós enzimmel kezelt phd plazmidot (izolálása a 20. példa szerint)

szintén Klenow fragmenttel kezeljük, az 5. példában közölt eljárás szerint. A pCHK22-18 plazmid $\sim 1,3$ kb méretű FnuDII-HindIII restrikciós enzimekkel hasított, feltöltött végű fragmentjét a phd plazmid BclI restrikciós enzimmel hasított, feltöltött végű vektor-fragmentjébe ligáljuk, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint. Ezzel a ligáló eleggyel transformálunk E.coli sejteket, lényegében a 3. példában leírt eljárás szerint. A plazmidot ezután az 1. példában leírt eljárással izoláljuk a sejtekből, és ahelyes orientációju plazmidot (bizonyítéka a ~ 840 bp méretű MaeII-StuI fragment) pL-HD jelzéssel látjuk el.

22. példa

A pL-HD2 plazmid előállítása

A pCHKC2-6 plazmid a KS1/4 monoklonális antitest könnyű láncának variábilis régióját kódoló DNS fragmentet tartalmaz egy humán könnyű lánc konstans régióját kódoló genomiális DNS fragmenthez kapcsolva. A pCHKC2-6 plazmid által kódolt variábilis régió aminosav-sorrendje megegyezik a természetes KS1/4 monoklonális antitest aminosav-sorrendjével. Azonban a pCHKC2-6 plazmid DNS-ben a karboxi-terminális arginint egy CGT triplett kódolja, míg a természetes szekvenciában ezen

a helyen CGG kodon van. Az *E.coli* K12DH5/pCHKC2-6 törzs NRRL-B-18358 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratory-nál. A pCHKC2-6 plazmid restrikciós és funkciós térképét a kísérő rajzok között a 13. ábrán mutatjuk be.

A tenyészetből a plazmid DNS-t az 1. példában közölt eljárással vonjuk ki, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37°C . A pCHKC2-6 plazmidot ezután FnuDII és HindIII restrikciós enzimekkel emésztjük, Klenow fragmenttel kezeljük, majd BclI restrikciós enzim mel emésztett feltöltött phd plazmidba ligáljuk, lényegében a 21. példában közölt eljárás szerint. A kapott plazmidot ezután *E.coli*-ba transzformáljuk, onnan kivonjuk és térképezzük, lényegében a 21. példában közölt leírás alapján. A megfelelő 840 bp méretű MaeII-StuI fragmentet tartalmazó plazmid jele pL-HD2.

23. példa

A pH1-HD plazmid előállítása

A pCH2A5 plazmid KS1/4 rágcsáló monoklonális antitest nehéz láncának variábilis régióját kódoló cDNS fragmentet tartalmaz, humán immunoglobulin IgG1 nehéz láncának konstans régióját kódoló genomiális DNS fragmenthez kapcsolva. Az *E.coli* K12MM294/pCH2A5 törzset NRRL B-18360

sorszám alatt szerezhethjük be a Northern Regional Research Laboratory-tól. A pCH2A5 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, a 14. ábrán mutatjuk be. A tenyészetből a plazmid DNS-t az 1. példában leírt eljárás szerint izoláljuk, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37°C .

Körülbelül $10\text{ }\mu\text{g}$ pCH2A5 plazmid DNS-t emésztünk EcoRI restrikciós enzimmal, lényegében az 5. példában leírt eljárás alapján. A DNS-t Klenow fragmenttel kezeljük és BamHI linkert (New England Biolabs) adunk hozzá, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint, majd a DNS-t BamHI restrikciós enzimmal emésztjük, lényegében az 5. példában leírt eljárás szerint. A $\sim 7,4$ kb méretű BamHI-EcoRI/BamHI restrikciós fragmentet ezután agaróz gélből izoláljuk, a 12. példában leírt eljárás szerint. Ezt a fragmentet ezután a BclI restrikciós enzimmal emésztett phd vektorba (20. példa) ligáljuk, lényegében a 2. példában közölt eljárás szerint. A DNSt ezután E.coli-ba transzformáljuk, visszaizoláljuk és a megfelelő orientációval rendelkező plazmidot (ennek bizonyítéka a ~ 780 bp méretű MaeIII-StuI restrikciós fragment) PH1-HD jelzéssel látjuk el.

24. példaA pH2-HD plazmid előállítása

A pCH2A5IG2 plazmid egy rágcsáló KS1/4 monoklonális antitest nehéz láncának variábilis régióját kódoló DNS-t tartalmaz, a humán IgG2 immunoglobulin nehéz láncának konstans régióját kódoló genomialis DNS fragmenthez kapcsolva. Az E.coli K12DH5/pCH2A5IG2 törzs NRRL B-18361 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratory-nál. A pCH2A5IG2 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 14. ábrán mutatjuk be. A tenyészetből a plazmid DNS-t az 1. példában leírt eljárással vonjuk ki, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37 °C.

Körülbelül 10 µg pCH2A5IG2 plazmid DNS-t emésztünk EcoRI restrikciós enzimmal, lényegében az 5. példában leírt eljárás szerint. A DNS-t Klenow enzimmal kezeljük, és BamHI linkert (New England Biolabs) adunk hozzá, lényegében a 2. példában leírt eljárás szerint és a DNS-t BamHI restrikciós enzimmal kezeljük az 5. példában leírt eljárás szerint. A ~6,1 kb méretű BamHI-EcoRI/BamHI restrikciós fragmentet ezután izoláljuk agaróz gélből, a 12. példában közölt leírás szerint. Ezt a fragmentet ligáljuk BclI restrikciós enzimmal emésztett phd vektorba (20. példa), a 2. példában közölt el-

járás szerint. A DNS-t ezután E.coli-ba transzformáljuk, visszaizoláljuk, majd a megfelelő orientációjú plazmidot (ennek bizonyítéka egy 780 bp méretű MaeIII-StuI fragment) pH2-HD jelzéssel látjuk el.

25. példa

A pH3-HD plazmid előállítása

A pCH2A5IG3 plazmid a KS1/4 rágcsáló monoklonális antitest nehéz láncának variábilis régióját kódoló cDNS fragmentet tartalmaz, humán IgG1 immunoglobulin nehéz láncának konstans régióját kódoló genomialis DNS fragmenthez kapcsolva. Az E.coli K12DH5/pCH2AIG3 törzs NRRL B-18362 sorszám alatt hozzáférhető a Northern Regional Research Laboratories-nél. A pCH2A5IG3 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a kísérő rajzok között, a 15. ábrán mutatjuk be. A plazmid DNS-t az 1. példában leírt eljárás alapján izoláljuk a tenyészetből azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37°C .

Körülbelül $10\text{ }\mu\text{g}$ pCH2A5IG3 plazmid DNS-t emésztünk EcoRI restrikciós enzimmel az 5. példában leírt eljárás szerint. A DNS-t Klenow fragmenttel kezeljük és BamHI linkert (New England Biolabs) adunk hozzá, a 2. példában leírt eljárás szerint, és a DNS-t BamHI restrikciós enzimmel emésztjük az 5. példában leírt eljárás szerint. A $\sim 7,4$ kb méretű BamHI-EcoRI/BamHI restrikciós

fragmentet agaróz gélből izoláljuk a 12. példában leírt eljárás szerint. Ezt a fragmentet ezután BclI restriktációs enzimmel emésztett phd vektorba (20. példa) ligáljuk, a 2. példában leírt eljárás szerint. A DNS-t ezután E.coli-ba transzformáljuk, visszaizoláljuk, majd a helyes orientációjú plazmidot (ennek bizonyítéka a ~780 bp méretű MaeIII-StuI restriktációs fragment) pH3-HD jelzéssel látjuk el.

26. példa

A pH4-HD plazmid előállítása

A pCH2A5IG4 plazmid a KS1/4 rágcsáló monoklonális antitest nehéz láncának variábilis régióját kódoló cDNS fragmentet tartalmaz a humán IgG4 immunoglobulin nehéz láncának konstans régióját kódoló genomiális DNS fragmenthez kapcsolva. Az E.coli K12DH5/pCH2A5IG4 törzs NRRL B-18363 sorszám alatt beszerezhető a Northern Regional Research Laboratories-nál. A pCH2A5IG4 plazmid restriktációs és funkcionális térképét a kísérő rajzok között a 15. ábrán mutatjuk be. A plazmid DNS-t az 1. példán leírt eljárás alapján izoláljuk a tenyészetből, azzal a különbséggel, hogy az inkubálás hőmérséklete 37 °C.

Körülbelül 10 µg pCH2A5IG4 plazmid DNS-t emésztünk az 5. példában közölt eljárás szerint. A DNS-t Klenow fragmenttel kezeljük és BamHI linkert (New England Biolabs) adunk hozzá a 2. példában leírt eljárás szerint és a DNS-t BamHI restrikciós enzimmel emésztjük, az 5. példában leírt eljárás szerint. A ~ 6,1 kb méretű BamHI-EcoRI/BamHI restrikciós fragmentet agaróz gélből izoláljuk a 12. példában leírt eljárás szerint. Ezt a fragmentet BclI restrikciós enzimmel emésztett phd vektorba (20. példa) ligáljuk, a 2. példában leírt eljárás szerint. A DNS-t ezután E.coli-ba transzformáljuk, visszaizoláljuk a plazmidot és a helyes orientációjú plazmid (ennek bizonyítéka a ~ 780 bp méretű MaeIII-StuI fragment) pH4-HD jelzéssel látjuk el.

27. példa

Expressziós vektorokkal transzformált eukarióta gazdasejt előállítása

A jelen találmány szerinti expressziós vektorok tartalmazzák az 1987. december 4-én benyújtott 07/129,028 sorszámú Amerikai Egyesült Államok-beli, Attornex Codket X-6606A szabadalmi leírásban közölt BK erősítő szekvenciát, amely szabadalom eredményeire referenciaként hivatkozunk. A BK erősítő szekvencia stimulálja a

gén-expressziót a E1A géntermék jelenlétében. Mivel a 293 sejt konstitutívan expresszálja az E1A génterméket, a 293 sejt hatékony gazdája a jelen találmány szerinti expressziós vektoroknak. A 293 sejtek 5-ös típusu adenovirussal transzformált humán embrionális vesesejtek (megjegyezzük, hogy bármely típusu adenovirus használható az E1A géntermék szolgáltatására), és CRL1573 sorszám alatt hozzáférhetők az ATCC-nél. A jelen találmány szerinti expressziós vektorok sok különböző sejtben funkcionálnak, akkor is, ha az E1A géntermék nincs jelen. Az E1A génterméket be lehet még juttatni az E1A-t nem termelő sejtekbe az E1A gént tartalmazó vektorral való transzformációval, mechanikusan tördelt adenovirus DNS-sel való transzformációval, vagy adenovirus fertőzéssel.

Az alább közölt transzformációs eljárás a 293 sejtekre vonatkozik, mint gazda-sejtvonalra; az eljárás azonban általánosan alkalmazható a legtöbb sejtvonalra. A 293 sejtek CRL 1573 sorszám alatt hozzáférhetők az ATCC-nél 25 mm²-es palackban, amely körülbelül $5,5 \times 10^6$ sejt egybefüggő egysejtrétegét tartalmazza Eagle's Minimum Essential Medium-ban, amelyet 10 % hővel inaktivált lószérum egészíti ki. A palackot 37 °C-on inkubáljuk, a tápközeget hetente kétszer cseréljük. A sejteket a tápközeget eltávolításával átoltjuk, mossuk

Hank's Balanced Salts oldattal (Gibco), 0,25 % tripszint adunk hozzá 1-2 percre, új tápközeggel öblítjük, leszívjuk, majd új palackokba tesszük át 1:5 vagy 1:10 átoltsági arányban.

A transzformálás előtt egy nappal a sejteket $0,7 \times 10^6$ sejt/lemez mennyiségben átoltsjuk. A tápközéget transzformálás előtt négy óránként cseréljük. TE pufferben oldott steril, etanollal kicsapott plazmid DNS-t használunk 2x tömény DNS- CaCl_2 oldat előállítására, amely 40 $\mu\text{g/ml}$ DNS-t és 250 mM CaCl_2 -t tartalmaz. 2x tömény HBS-t készítünk, amely 280 mM NaCl, 50 mM Hepes és 1,5 mM nátrium-foszfát összetételű, pH = 7,05-7,15. A 2x tömény DNS- CaCl_2 oldatot cseppenként adjuk azonos térfogatu steril 2x HBS-hez. Egy 1 ml-es, gyapot-dugós steril műanyag pipettát teszünk a 2x tömény HBS-t tartalmazó keverő-csőbe, és a csövön átfújva buborékokat bocsátunk át az oldaton, miközben DNS-t adunk hozzá. A kalciumfoszfát-DNS csapadékot keverés nélkül hagyjuk kialakulni szobahőmérsékleten 30-45 perc alatt.

A csapadékot ezután a műanyag pipettával óvatosan pipettázva összekeverjük, majd lemezenként egy ml csapadékot adunk közvetlenül 10 ml, a befogadó sejteket fedő növesztő táptalajhoz. Négy órán át 37°C -on inkubálva a tápközéget 10 % borjúmagzat szérummal kiegészített DMEM táptalajjal helyettesítjük, és a sejteket további 72 órán át hagyjuk inkubálódni a szelekciós nyomás alkalmazása előtt.

Azoknál a plazmidoknál, amelyek nem tartalmazzak eukarióta sejtekben működő szelekciós markereket, a transzformációs eljárás során plazmid-keveréket használunk: egy expressziós vektort, amelyből hiányzik a szelekciós marker; és egy olyan expressziós vektort, amely eukarióta sejtekben működő szelekciós markert tartalmaz. Ez a ko-transzformációs technika lehetővé teszi azoknak a sejteknek az azonosítását, amelyek mindkét transzformáló plazmidot tartalmazzák.

A higromicin rezisztenciát kódoló gént tartalmazó plazmiddal transzfektált sejtek esetén higromicint adunk a növesztő táptalajhoz 200-400 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban. A sejteket ezután 37 °C-on 2-4 hétig inkubáljuk, 3-4 naponként cserélve a tápközeget. A kapott higromicin-rezisztens telepeket külön-külön palackokba visszük át, jellemzés céljából. A neomicin (G 418 is használható neomicin helyett) rezisztens telepek szelekcióját a higromicin-rezisztens sejtek szelekciójára leírt eljárás szerint végezzük, azzal a különbséggel, hogy neomicint használunk 400 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban és nem higromicint. A 293 sejtek dhfr pozitívak, így a 293 transzformánsokat, amelyek a dhfr gént tartalmazó plazmidokat hordozzák, nem szelektálhatjuk közvetlenül a dhfr pozitív fenotípus alapján, ami a sejteknek azt

a képességét jelenti, hogy képesek hipoxantint és timint nem tartalmazó táptalajon nőni. Azokat a sejtvonalakat, amelyekből hiányzik a működőképes dhfr gén és dhfr tartalmu plazmiddal vannak transzformálva, a dhfr+fenotípus alapján szelektálhatjuk.

A dihidrofolát-reduktáz (dhfr) génnek szelekciós markerként való alkalmazása dhfr-deficiens sejtvonalba gén vagy plazmid bejuttatásakor, valamint a metotrixát ezt követő alkalmazása a plazmid kópia-számának amplifikálására, jól ismert a szakirodalomban. Habár a dhfr szelektálható és amplifikálható markerként való alkalmazását a dhfr-termelő sejtekben nem tanulmányozták alaposan, a szakirodalomban fellelhető bizonyítékok azt sugallják, hogy a dhfr gén használható szelekciós markerként dhfr-termelő sejtekben valamint gén- amplifikálásra. A jelen táblomány alkalmazását nem korlátozza a használt szelekciós marker. Sőt, amplifikálható markerek, ugyanint a metallotionein gének, adenozin-dezamináz gének, vagy a multigén rezisztens család tagjai, például a P-glikoprotein is használható. A 293 sejteknél előnyösen azzal a vektorral transzformálunk, amely szelekciós markert tartalmaz, például a higromicin B rezisztencia gént, majd metotrexátot alkalmazva amplifikálunk, amit

nem használhatunk rágcsgáló dhfr-tartalmú plazmidok szelekciójára 293 sejtekben.

Az AV12 sejtvonalat (ATCC CRL 9595) a 293 sejtek transzformálására leírt eljárás alapján transzformáljuk. Az AV12 sejtek konstitutívan kifejezik az E1A génterméket, így előnyös gazdaszervezetei a jelen találmány szerinti eukarióta expressziós vektoroknak. Azonban a 293 sejtektől eltérően, az AV12 sejteket közvetlenül szelektálhatjuk metotrexáttal (200-500 mM) rágcsgáló dhfr gént tartalmazó vektorral való transzformálás után. Egy nehéz lánc expressziójához az AV12 sejteket bármely, nehéz láncot kódoló expressziós vektorral kell transzformálni. Azonban a nehéz lánc nem választódik ki a felülszóba, ha az AV12 sejtek nincsenek ko-transzformálva egy könnyű láncot kódoló vektorral. A könnyű láncok kiválasztódnak a gazdas sejtekből könnyű láncot kódoló vektorral való transzformálás után. Ily módon a könnyű és nehéz láncok különböző kombinációit expresszáljuk az AV12 sejtek ko-transzformációjával és szelekciójával. Egy komplett szerkezetű, kiválasztott immunoglobulinra való vizsgálathoz kiválasztott nehéz lánc jelenlétét kell vizsgálni.

28. példaImmunoglobulin termelés vizsgálata

A 27. példában előállított metotrexát rezisztens transzformánsokat 100 mm-es szövettenyésztő csészében növesztjük, néhány száz sejtklón/szövettenyésztő csésze sűrűségben. A tápközeget leöntjük, majd a sejteket kétszer leöblítjük 5-5 ml Hank's Balanced Salt oldattal (Gibco). 0,45 %-os steril agar oldatát (Sigma Type 4 agaróz, katalógus-szám // A3643, Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178) úgy készítjük el, hogy 1 ml 1,8 %-os agart (47°C) 3 ml Dulbeccós Modified Eagle's (DME) Salts (Gibco) oldattal keverünk össze, majd ebből a 0,45 %-os agar oldatból 2 ml-t rétegzünk a sejtekre.

Nitrocellulóz szűrőket (Schleicher and Schuell, Inc., Keene, NH 03431) forralunk, majd 2 órán autoklávozunk, hogy a sejtekre toxikus nedvesítő anyagot eltávolítsuk. A szűrőket ezután az agar-rétegre helyezzük. A légbuborékokat eltávolítjuk, és a lemezeket 1-3 órán át 37°C -on inkubáljuk. A szűrőket, amelyeket a telepek későbbi azonosítása céljából, a lemezen való eredeti elhelyezkedés jelölése céljából megjelöltünk, eltávolítjuk és PBS-be helyezzük (50 mM Tris-HCl, pH=7,2; és 150 mM NaCl).

Hogy a sejteket életben tartsuk a csészében miközben a szűrőket analizáljuk, a sejteket 8 ml következő összetételű eleggyel rétegezzük le: 2 ml 1,8 %-os agar (47°C), 2 ml DME sók (37°C) és 4 ml, 20 % borjumagzat szérumot tartalmazó DME sók (37°C). A sejteket ezután 37°C -on inkubátorba helyezzük.

A szűrőkön minden mosást és reakciót úgy végzünk, hogy a szűrők rázó-asztalon vannak. A szűrőket először blokkoljuk, szobahőmérsékleten inkubálva 5 % tejet tartalmazó PBS-ben. A szűrőket ezután négyszer öblítjük PBS-sel (5 perc/öblítés). $10\text{ }\mu\text{l/ml}$ koncentrációju biotinilezett kecske anti-humán nehézlánc (Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Rd., Burlingame, CA 94010) poliklonális antitest 2,5 %-os szarvasmarha szérum albuminban lévő oldatából annyit adunk a szűrőhöz, hogy elborítsa azt, majd 1 órán át 37°C -on inkubáljuk.

Poliklonális antitestet azzal az eljárással állíthatunk elő, melyet E.A. Kabat közöl a Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry című könyben (kiadó Holt Rhinehart and Winston, 1968). Monoklonális antitestet, amely szintén használható a vizsgálatban a következő irodalmi hivatkozások szerint állíthatunk elő. Kohler and Milstein, Nature, 256, 495 (1975);

4 696 895 sorszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás EPO Pub. No. 205046? Laurell et al., FEBS, 191 (1), 75 (1985); Suzuki et al., J. Biochem., 97, 127-138; és EPO Pub. No. 138222. Az ebben a vizsgálatban használt avidin D és biotilezett tormaperoxidáz (HRP) a Vectastatin kit-ből származik (Vector Laboratories, Inc.) A biotin is a Vector Laboratories, Inc.,-től származik.

A szűrőket négyszer mossuk 4 °C-on PBS-sel. Ezután avidin D-t és biotinilezett tormaperoxidázt készítünk és a Vectostatin kit-ben (Vector Laboratories) talált használati utasítás szerint a szűrőkhöz adjuk. A szűrőket ezután HRP-konjugált avidin D-vel inkubáljuk 1 órán át 4 °C-on (hosszabb inkubálási idő használható, például éjszakán át, ha kismennyiségű fehérje szekretálódik); a szűrőket ezután négyszer mossuk PBS-sel 4 °C-on.

A szűrőkön lévő indikátor szín előhívásához körülbelül 30 mg HRP színhívó reagens (4-klór-1-naftol, Sigma) jéghideg abszolút metanolban oldott oldatát adjuk 50 ml PBS-hez és 30 µl 30 %-os H₂O₂-hez. Ezt az elegyet a nitrocellulóz szűrőkhöz adjuk, amelyeket szobahőmérsékleten addig inkubálunk, amíg a szín meg nem jelenik. A találmány szerinti antitestből a legtöbbet kiválasztó telepeket megjelöljük a szűrőkön, nemcsak azon

az alapon, hogy melyiknél jelenik meg leghamarabb a szín, hanem a filteren lévő sötétebb foltok alapján.

Miután a szűrőket előhívtuk a szűrőket az eredeti lemezekkel egyeztetve meghatározzuk, hogy melyik telephez melyik folt tartozik a szűrőn. A legtöbb antitestet szekretáló telepeket kiválasztjuk, és az antitest előállítására használjuk.

A szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a fenti vizsgálati módszer csak illusztratív jelleggel mutatja be az erősen szekretáló sejtvonalak kiválasztási módszerét. Az eljárás során különböző vizsgálati módszereket használhatunk sikerrel. Például dupla-antitest reakciót használhatunk, amelyben a biotinilezett kecske anti humán nehéz-lánc antitestet kecske anti-humán nehéz-lánccal (IgG) és biotinilezett anti-kecske IgG antitesttel helyettesítjük.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás KSA megkötésére képes antitest láncok expressziójára transzformált vagy transzfektált sejtekkel, azzal j e l l e m e z v e , hogy

- a) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező könnyű láncot kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr
Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu
Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
Arg Asn Glu Cys

- b) az emésztett vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk, és
- c) az említett gazdasejtet az említett könnyű láncu gén expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

2. Eljárás KSA megkötésére képes antitest
láncok expressziójára transzformált vagy transzfektált
sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező
nehéz láncot kódoló gént tartalmazó rekombi-
nális DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys
Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu
Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln
Asn Met Arg Thr Met Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ser
Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys
Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser
Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe
 Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
 Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
 Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

- b) az említett vektort emlős gazdasejtbe transzformáljuk vagy transzfektáljuk és
- c) az említett gazdasejtet az említett nehéz lánc expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

3. Eljárás KSA megkötésére alkalmas anti-test lánc-származékok expressziójára transzformált vagy transzfektált sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) az 1. igénypont szerinti aminosav szekvenciát kódoló DNS molekula mutációjával keletkező könnyű-lánc származékot kódoló gént tartalmazó rekombinánc DNS vektort állítunk elő,
- b) az említett vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk,
- c) az említett gazdasejtet az említett könnyű-lánc származék expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

4. Eljárás KSA megkötésére alkalmas antitest lánc-származékok expressziójára transzformált vagy transzfektált sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) a 2. igénypont szerinti aminosav szekvenciát kódoló DNS molekula mutációjával keletkező nehéz-lánc származékot kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő,
- b) az említett vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk,
- c) az említett gazdasejtet az említett nehéz-lánc származék expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

5. Eljárás KSA megkötésére képes variábilis régiókat tartalmazó kiméra antitest láncok expressziójára transzfektált vagy transzformált sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező könnyű-lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 Ile Lys Gly

- b) az említett vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk és
- c) az említett gazdasejtet az említett könnyű-lánc gén expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a rekombináns DNS vektor a 21. példában leírt pL-HD plazmid.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a transzfektált vagy transzformált sejt egy AV12 sejt.

8. Eljárás KSA megkötésére alkalmas variábilis régiókat tartalmazó kiméra antitest láncok expressziójára transzfektált vagy transzformált sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) a következő aminosav szekvenciával rendelkező könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő.

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 Ile Lys Arg

- b) az említett vektort transzfektáljuk vagy transzformáljuk egy emlős gazdasejtbe és
- c) az említett gazdasejtet az említett könnyű-lánc gén expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

9. Eljárás KSA megkötésére alkalmas variábilis régiókat tartalmazó kiméra antitest láncok expressziójára transzfektált vagy transzformált sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) a következő aminosav szekvenciával rendelkező nehéz-lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
 Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu
 Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln
 Asn Met Arg Thr Met Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ser
 Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

- b) az említett vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk, és
- c) az említett gazdasejtet az említett nehéz-lánc gén expressziójára alkalmas körülmények

között tenyésztjük.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rekombináns DNS vektor a 23. példában leírt pH1-HD plazmid, a 24. példában leírt pH2-HD plazmid, a 25. példában leírt pH3-HD plazmid, vagy a 26. példában leírt pH4-HD plazmid.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a transzfektált vagy transzformált sejt egy AV12 sejt.

12. Eljárás KSA megkötésére képes variábilis régiókat tartalmazó kiméra antitestek expressziójára transzfektált vagy transzformált sejtekkel, azzal jellemezve, hogy

- a) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser-Val
Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys Arg

- b) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező nehéz lánc variábilis régiót kódoló rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys
 Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
 Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu
 Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln
 Asn Met Arg Thr Met Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ser
 Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

vagy

- c) az említett könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént és az említett nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő, és
- d) az említett a) és b) vektorokat, illetve az említett c) vektort emlős gazdasejtbe transzformáljuk vagy transzfektáljuk, és
- e) az említett gazdasejtet az említett variábilis régiókat kódoló gének expressziójára alkalmas körülmények között tenyésztjük.

13. Eljárás KSA megkötésére képes variábilis régiókat tartalmazó kiméra antitestek expressziójára transzfektált vagy transzformált sejtekben, azzal jellemezve, hogy

- a) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 Ser Tyr Met Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys
 Pro Trp Ile Phe Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
 Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 Ile Lys Gly

és

- b) a következő aminosav-szekvenciával rendelkező nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombináns DNS vektort állítunk elő:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys
 Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
 Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu
 Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln
 Asn Met Arg Thr Met Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg Phe Ile Ser
 Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

vagy

- c) az említett könnyű lánc variábilis régióját kódoló gént és az említett nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó rekombi-

náns DNS vektort állítunk elő, és

- d) az említett a) ésb) vektorokkal illetve az említett c) vektorral emlős gazdasejtet transzformálunk vagy transzfektálunk, és
- e) az említett gazdasejtet az említett variábilis régiókat tartalmazó gén expresszióját lehetővétevő körülmények között expresszáljuk.

1 14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) plazmid a pL-HD plazmid és a b) plazmid a pH1-HD plazmid.

15. A 13.igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) plazmid a pL-HD plazmid és a b) plazmid a pH2-HD plazmid.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) plazmid a pL-HD plazmid, és a b) plazmid a pH3-HD plazmid.

17. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a) plazmid a pL-HD plazmid és a b) plazmid a pH4-HD plazmid.

18. A 14-17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a transzformált

vagy transzfektált sejt az AV12 sejt.

19. Eljárás rekombináns és kiméra antitest láncok expressziójára rekombináns nem-limfoid gazdasejtben, azzal jellemezve, hogy

- 1) az említett gazdasejtek a következő összetételű rekombináns DNS expressziós vektorral vagy vektorokkal transzformáljuk:
 - a) tartalmaz egy az említett nem limfoid sejtben működőképes promotert és transzlációs aktiváló szekvenciát; és
 - b) egy rekombináns vagy kiméra antitest láncot vagy láncokat kódoló DNS szekvenciát, amely DNS szekvencia az említett promoterhez és aktiváló szekvenciához az expressziónak megfelelő pozícióba van helyezve; és
- 2) az 1) lépésben transzformált említett gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztjük, amely alkalmas rekombináns vagy kiméra immunoglobulin láncok expressziójára.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rekombináns gazdasejt vagy a 293 vagy az AV12 sejt.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás,
azzal jellemezve, hogy a 2. lépésben a rekombináns gazda-
sejt az AV12 sejt.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás,
azzal jellemezve, hogy a rekombináns DNS expressziós vek-
tor a pL-HD, pH2-HD, a pH3-HD vagy pH4-HD plazmid.

A meghatalmazott
BUDAPESTI KENZETKÖZI
ÜGYVÉDI MUNKAKÖZÖSSÉG
SZAKTUDALMI IRODA
BUDAPEST, SZABADTÉRI 10 1533 13

15 db oldal (15 db va)
+ 173 oldal

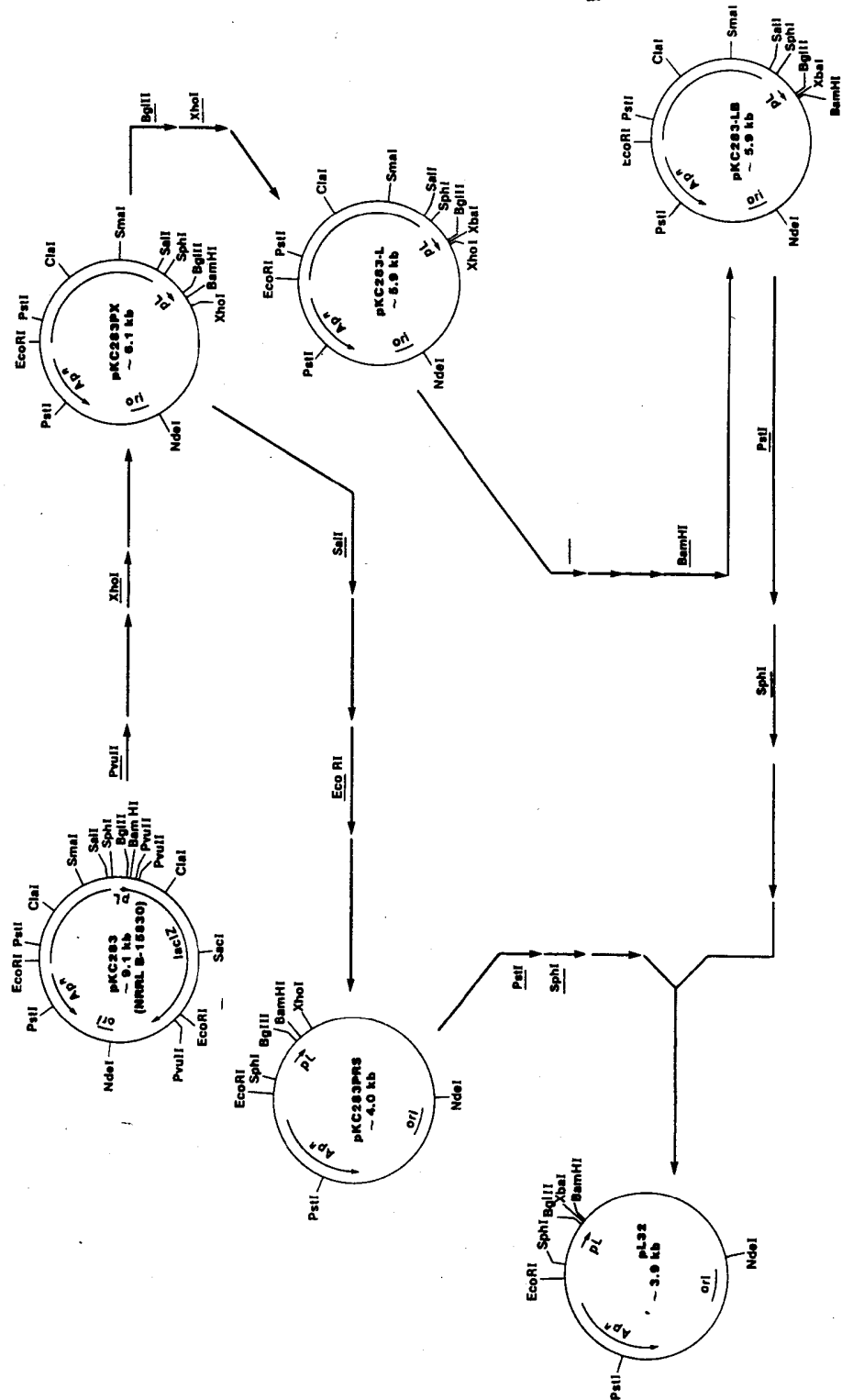
Földvár

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

50870

15/1

I. ÁBRA

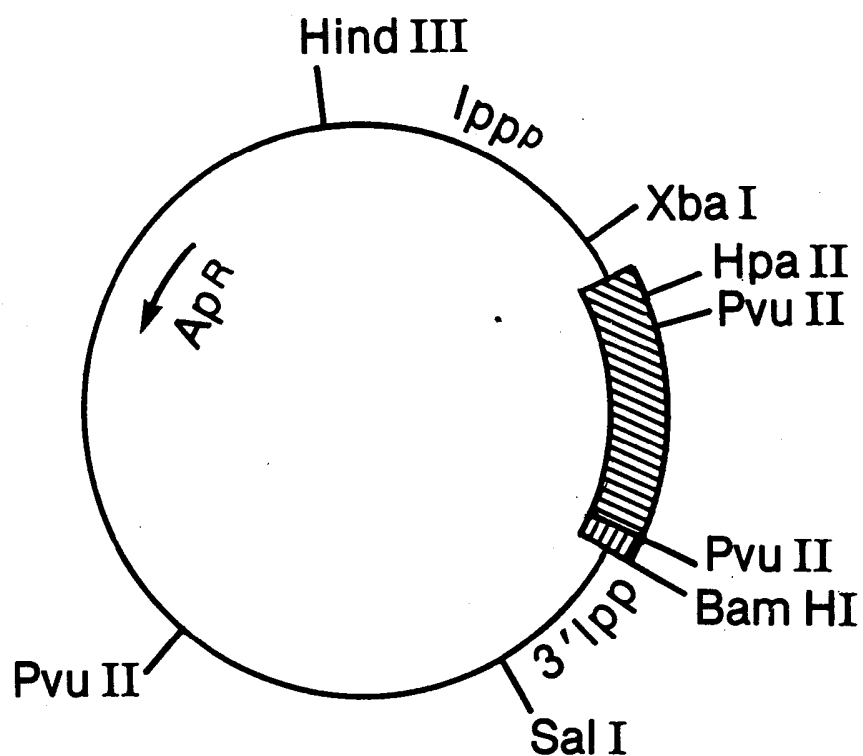


Handwritten signature and date: 1983-73

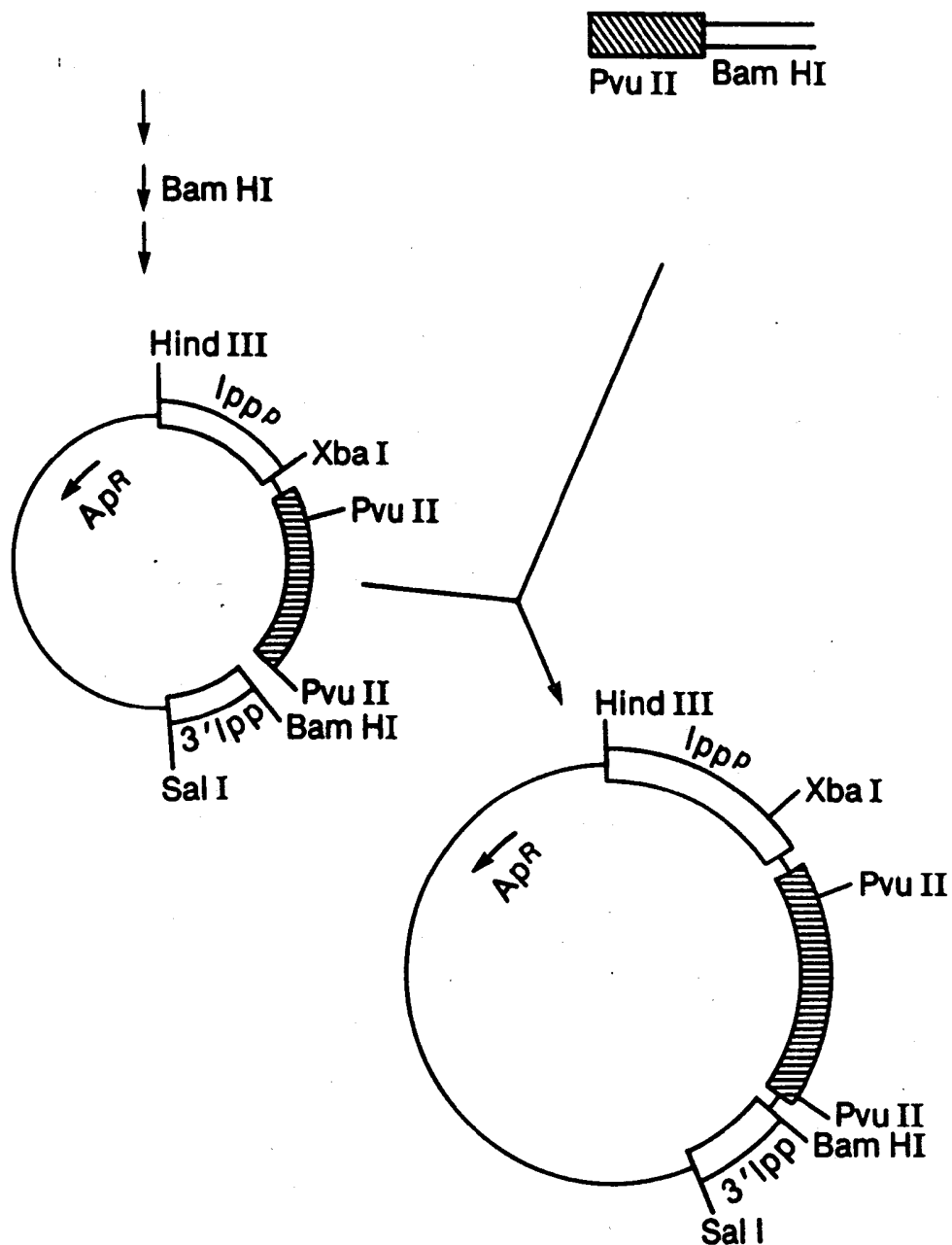
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

15/2

2 . ÁBRA



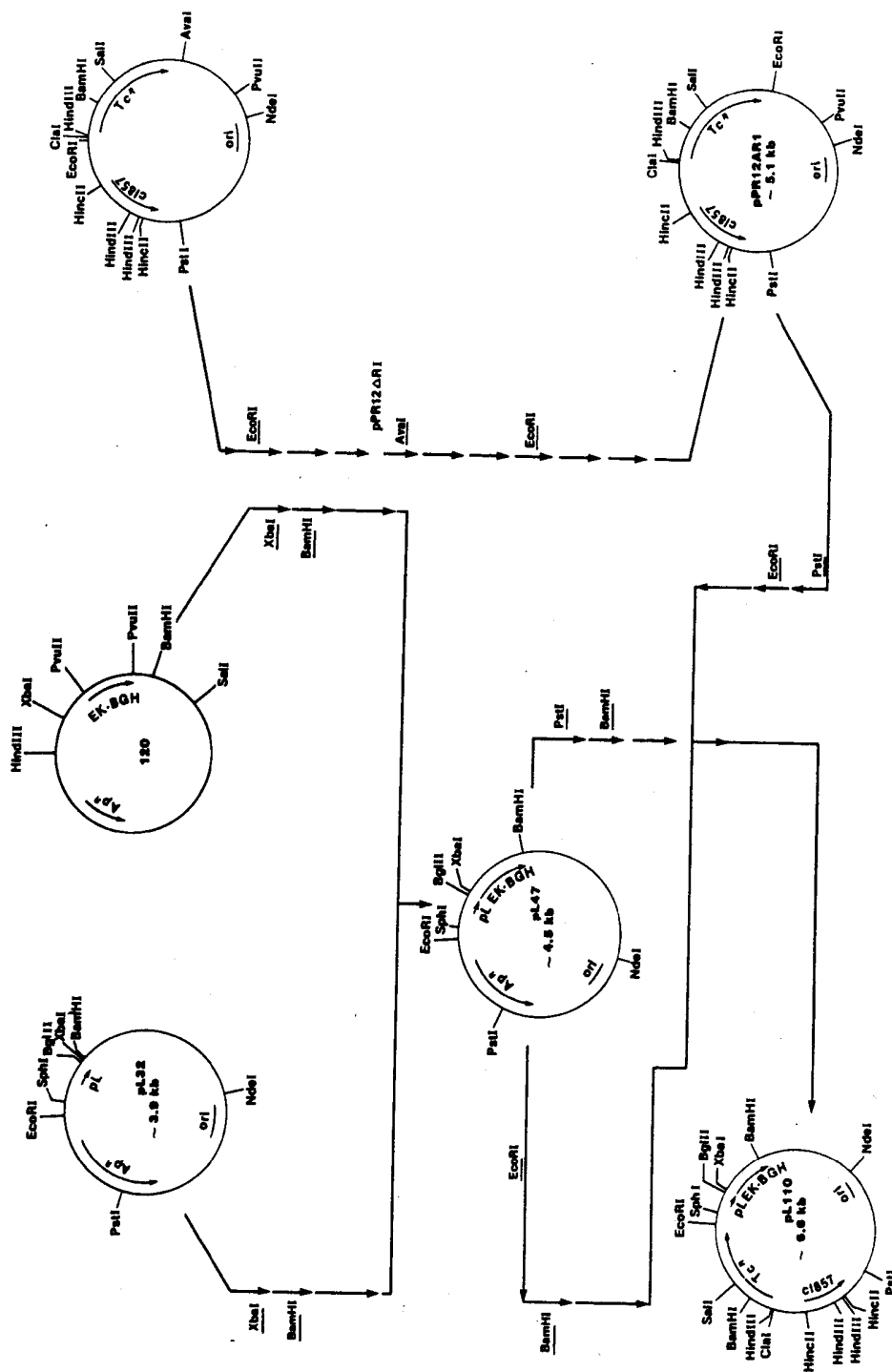
3. ÁBRA



ELJÁRÁSI TUDOMÁNYOS
KUTATÁSOK
S
BALHATÁRSÁGI KUTATÁSOK
1925/89

15/4

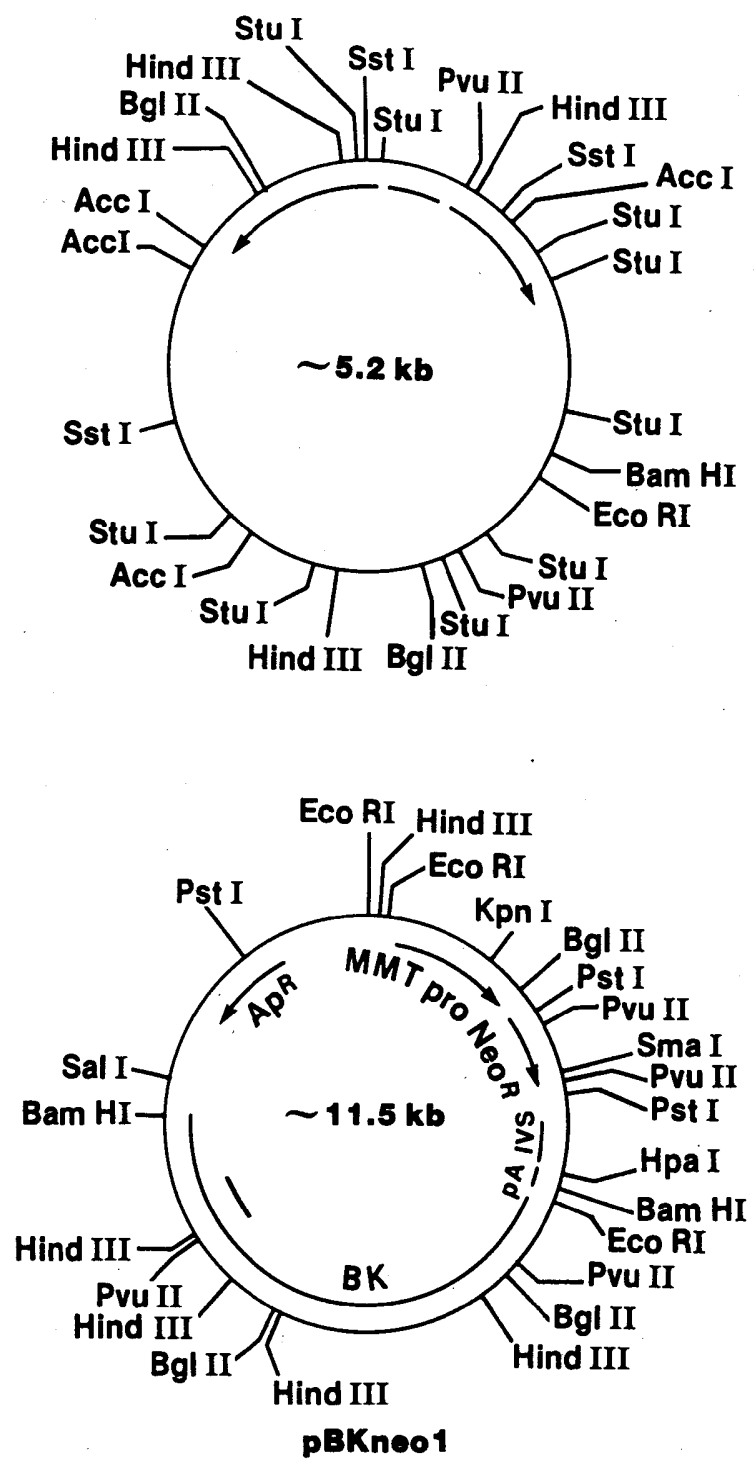
4. ÁBRA



PUDAPESTI
ÜSTVÉI
SZÁM
1925/89

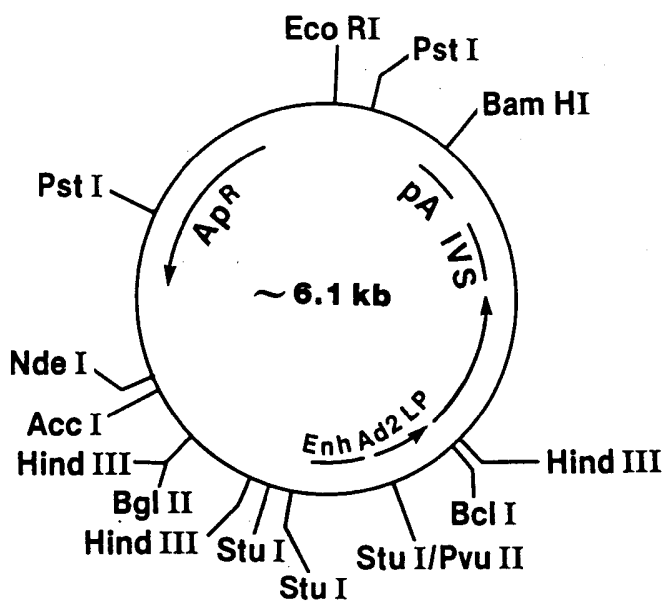
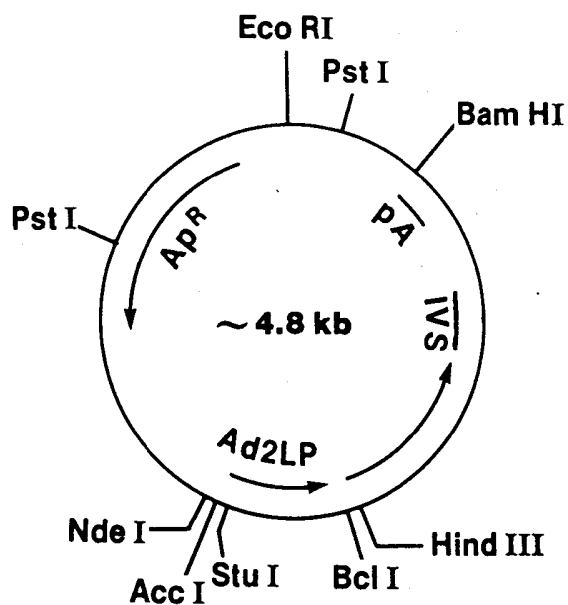
Handwritten signature

5. ÁBRA



FÜNYEÖSTI HENDRIK 71
GALVET 10 1033-73

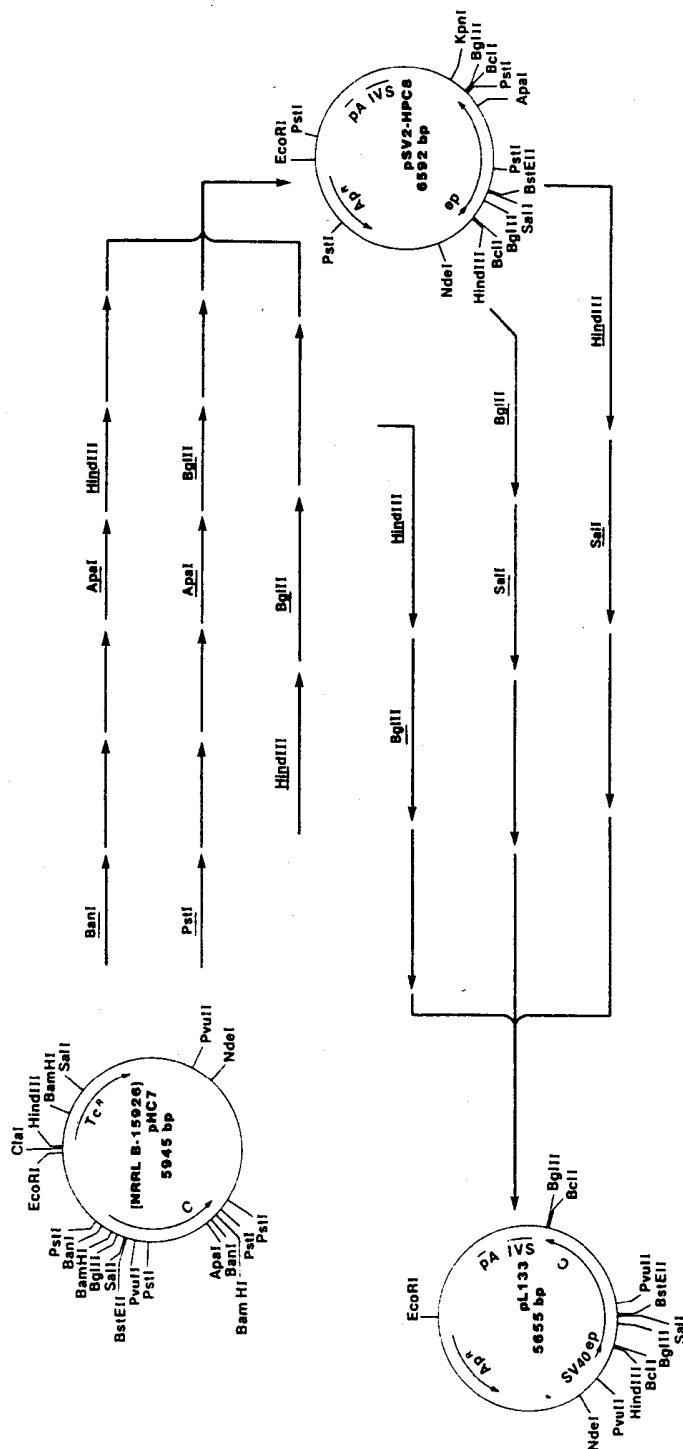
6. ÁBRA



Handwritten signature and date: 1989.10.20

15/7

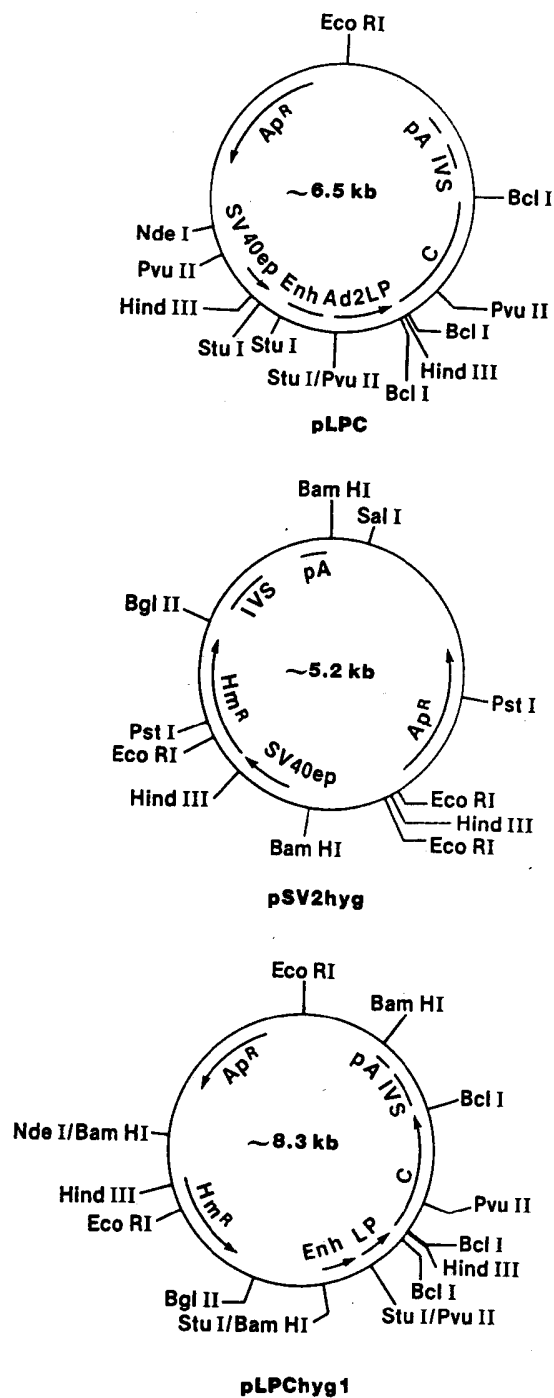
7. ÁBRA

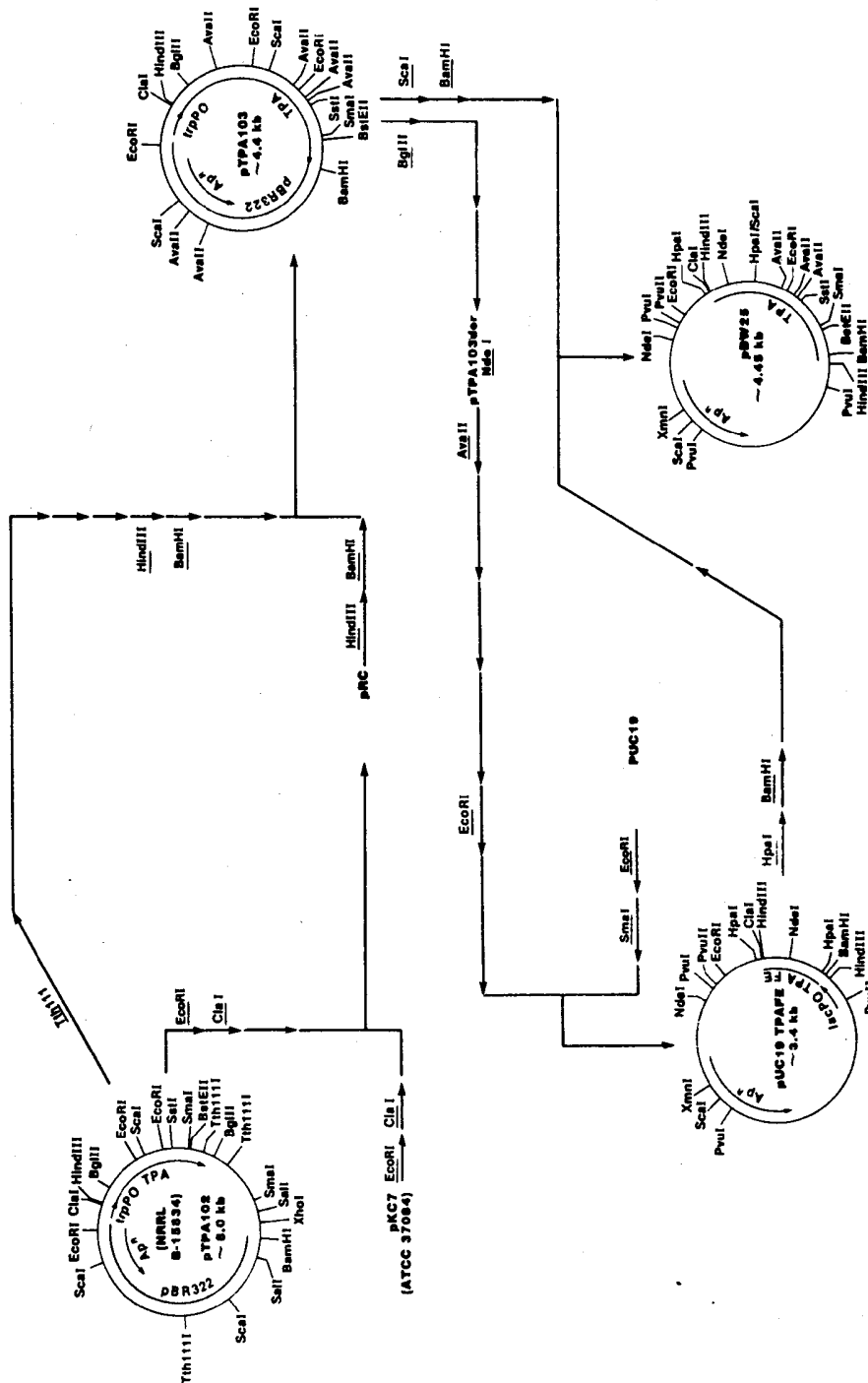


BUHAPRESTI
ÜSTÜN
SZARAD
DATE

ay

8. ÁBRA

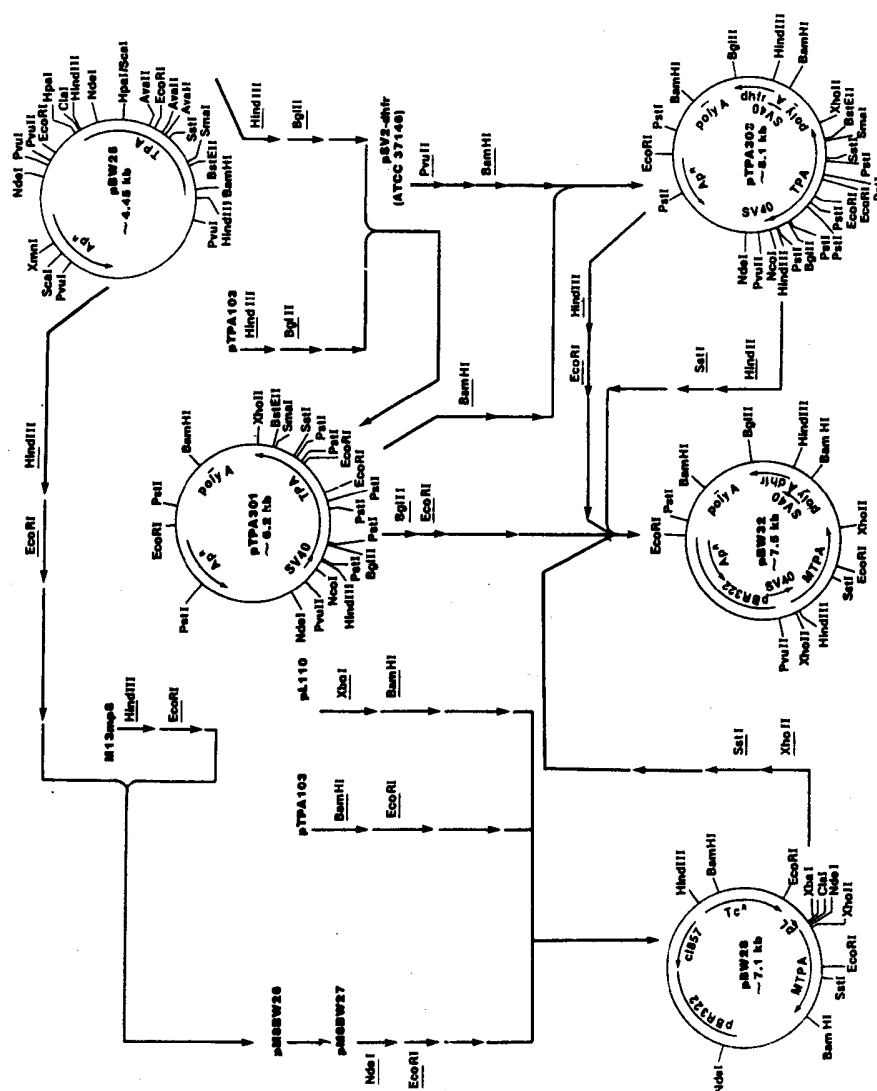




Handwritten signature

15/10

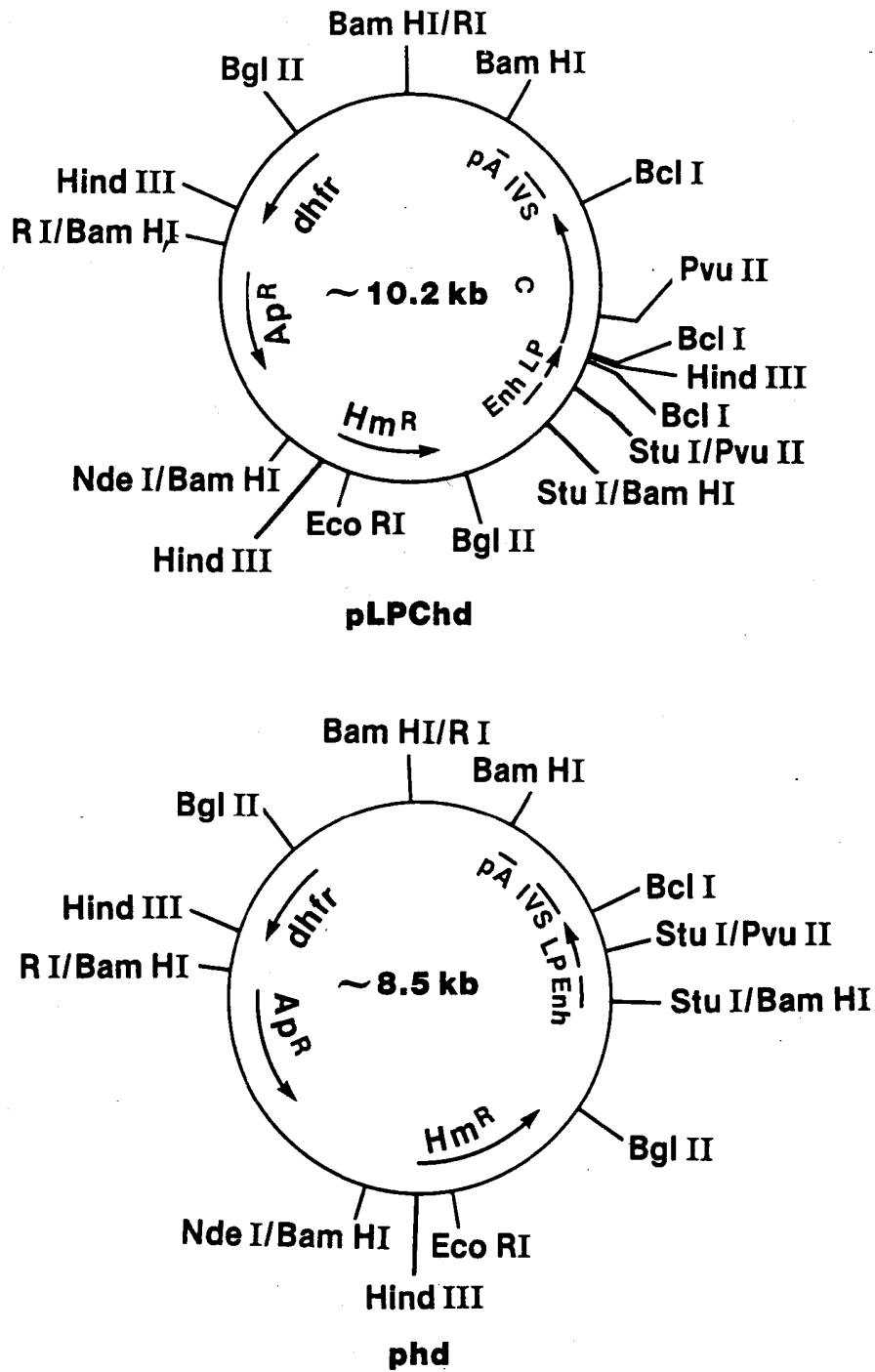
10. ÁBRA



PUDOWESTI RE
USYVERI
SZARADANI
DALSZAMAT 10

Handwritten signatures and markings are present over the typed text.

II. ÁBRA

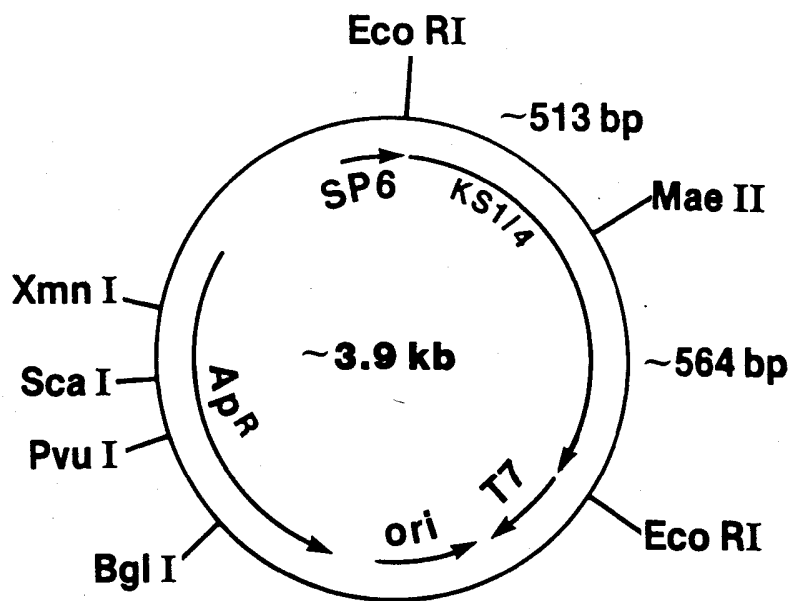
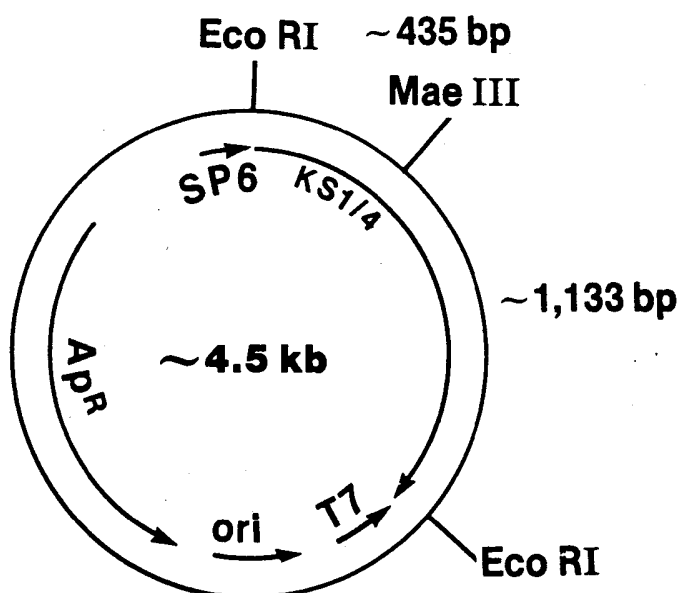


Handwritten signatures and stamps are present at the bottom right of the page.

LETÉTELI
DÁNY

15/12

12. ÁBRA

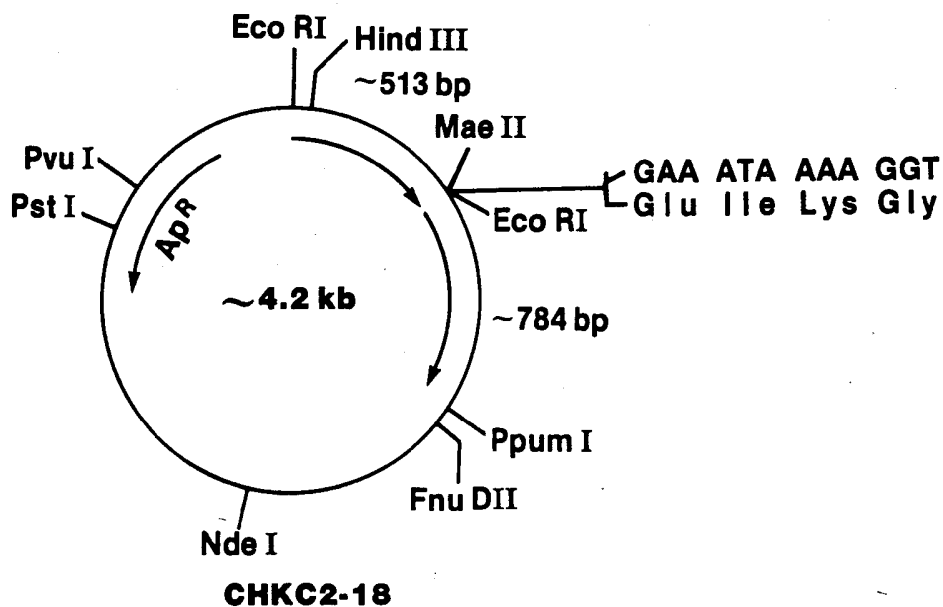
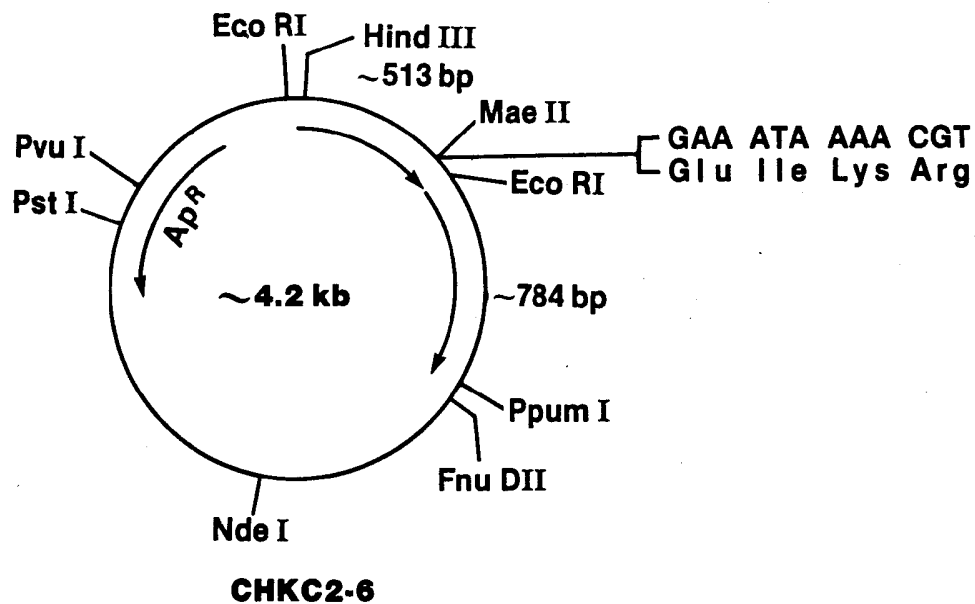
**pGKC2310****pG2A52**

TEŐZI
SZÉSSÉG
1994
10 133-73

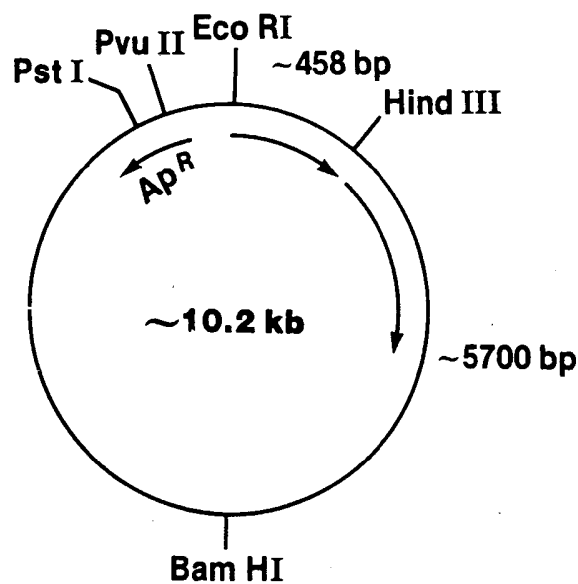
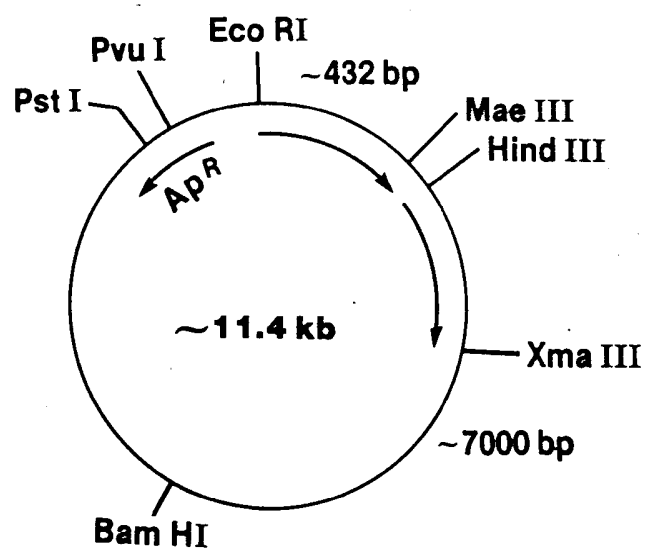
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

15/13

13. ÁBRA

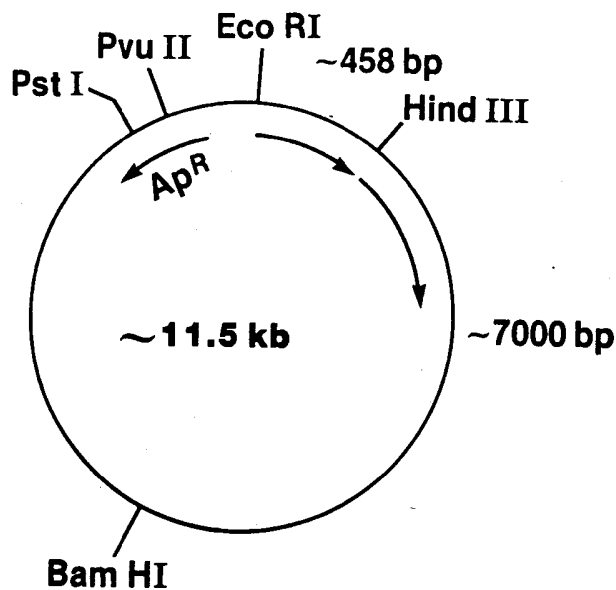


14. ÁBRA

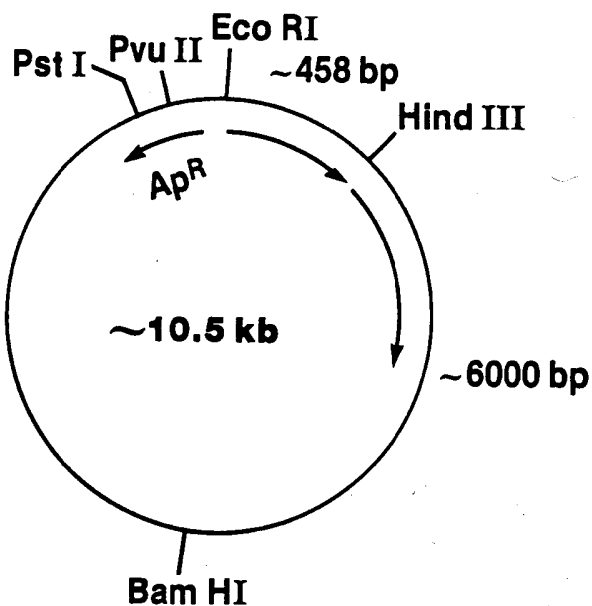


KÖZZÉTÉTELI
 ÚJRAKÉZELT
 S. ÁRUÁLLÁS
 1983. 7. 3.

15. ÁBRA



CH2A5IQ3



CH2A5IQ4