

Eljárás peptidek előállítására *in vitro* transzkripció/transzláció rendszer alkalmazásával

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására olyan reakciórendszer alkalmazásával, amely egy DNS-nek RNS-sé történő átírását, majd az előállított RNS transzlatálását foglalja magában, vagy olyan reakciórendszer alkalmazásával, amely egy RNS *in vitro* transzlatálását foglalja magában, és az eljárás során a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részét vagy valamennyi elemét egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölik, és az anyagpár másik tagját adszorbensként alkalmazzák a transzlációt követően a jelölt fehérjekomponensek megfogására. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti reakciórendszer kialakításához szükséges fehérjekomponensek készlete, valamint a találmány szerinti eljárással előállított termék.

A találmány szerinti eljárás fehérjetermékek előállítására alkalmazható.



P0301723

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

## **Eljárás peptidek előállítására *in vitro* transzkripciós/transzlációs rendszer alkalmazásával**

A találmány tárgyát képezi eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására egy DNS-nek RNS-sé történő átírását és az így előállított RNS transzlatálását magában foglaló reakciórendszer, vagy egy RNS *in vitro* transzlatálását magában foglaló reakciórendszer (a leírásban a továbbiakban az "*in vitro* transzkripciós/transzlációs reakciórendszer" kifejezést használjuk) alkalmazásával, valamint a fehérjekomponensek készlete, amely ennek a reakciórendszernek a kialakításához szükséges enzimeket és faktorokat tartalmazza.

A találmány szerinti eljárás fehérjetermékek magas hozammal, nagy tisztaságban történő előállítására alkalmazható.

Jól ismertek *Escherichia coliból*, nyúl eredetű retikulocitákból vagy búzacsírából származó, sejtmentes, fehérjeszintézisre szolgáló rendszerek [Current Opinion in Biotechnology 9, 534-548 (1998); J. Biotechnology 41, 81-90 (1995)]. Ezekben a sejtmentes rendszerekben a peptidek né-



hány órán belül megszintetizálhatók. Konkrétan, fehérjék rövid idő alatt szintetizálhatók összehasonlítva azzal az esettel, amikor idegen géneket inszertálunk gazdasejtekbe, majd a sejtekben expresszáljuk őket [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 412-417 (1997); FEBS Letters 414, 268-270 (1997)]. Nyilvánvaló és várható, hogy a sejtmentes rendszerekben történő fehérjeszintézisnek legalább is elméletileg számos technikai előnye van, az idegen génnek gazdasejtekbe történő beépítése és az ott történő expressziójával szemben. Konkrétan, az ilyen sejtmentes fehérjeszintézis-rendszerekkel a gazdasejtre toxikus peptidok vagy olyan peptidok is előállíthatók, amelyeket a gazdasejtben keletkező proteázok emészthetnek. Ilyen rendszerekben nem természetes aminosavakkal töltött aminoacil-tRNS-ekkel nem természetes aminosavak konkrét helyzetekbe építhetők be, így természetben elő nem forduló peptidszármazékok is előállíthatók [Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24, 435-462 (1995)], vagy mRNS-ből, riboszómából és peptidből álló komplexek (poliszóma-szerkezetek) alakíthatók ki. A poliszóma-szerkezeteket és használatukat több közleményben ismertettük [He, M. és mtsai., J. Immunological Methods 231, 105-117 (2000); Schaffitzel, C., J. Immunological Methods 231, 119-135 (2000); Roberts, R. W., Current Opinion in Chemical Biology 3, 268-273 (1999) és ugyanott 9, 534-548 (1998) (előnyösen az 543. oldalon és azután), valamint FEBS Lett. 450, 105-110 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14130-14135 (1998) és Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4937-4942 (1997)].



Kezdetben nyers sejtkivonatokat alkalmaztak, de az ilyen módon végzett reakciók nem stabilak, és peptidek csak alacsony hozammal, konkrétan az élő sejtek 0,1-0,01%-ában szintetizálódtak. A későbbi vizsgálatokban kiderítették melyek a sejtkivonatokban lévő, a génexpresszióhoz szükséges komponensek, és ezzel párhuzamosan kimutatták a felesleges komponenseket és inhibitorokat (például endogén, mRNS-t bontó nukleázt [RNA 6, 1079-1090 (2000)]). Kísérleteket tettek ezeknek a felesleges komponenseknek az eltávolítására. A hagyományos eljárás, amelyben a sejtmentes kivonatot veszik alapul és eltávolítják belőle a felesleges komponenseket, azonban nem megfelelő, mivel a reakcióhoz szükséges energia elfogy, és így a reakció körülbelül "batch" rendszer használata esetén 1 órán belül megáll a fehérjeszintézisben. Bebizonyították, hogy ezt a problémát a nukleotidtrifoszfát tartalékok kimerülése [Biochim. Biophys. Acta. 1293, 207-212 (1996); J. Biotechnol. 48, 1-8 (1996)], kis molekulájú melléktermékek, például endogén enzimek által képzett trifoszfát-hidrolizátumok felhalmozódása [Biochemistry 22, 346-354 (1983); J. Biol. Chem. 260, 15585-15591 (1985)] és a transzkripció/transzláció reakcióhoz nem szükséges faktorok által történő energiafelhasználás okozza [J. Ferment. Bioeng. 84, 7-13 (1997); J. Biotechnol. 61, 199-208 (1998)].

A reakció rövid időn belüli leállításának problémája egy szubsztrátnak a peptidet szintetizáló transzkripció/transzláció reakciórendszerbe történő folyamatos betáplálásával megoldható. Ebben az esetben azonban egy másik



probléma áll fent, mégpedig az, hogy a reakció rosszul ismételtető. Ez a probléma búzacsírárt alkalmazó rendszerben egy, a csírában lévő riboszóma inaktivátor (tritin) és egy translációs iniciációs inhibitor jelenlétének kimutatásával oldható meg, és olyan eszközökkel, amelyek eltávolítják ezeket az anyagokat a csírából [Bio Industry 17(5), 20-27 (2000)]. Egy további probléma még mindig marad, nevezetesen, hogy az ilyen rendszer sok energiát fogyaszt a transláció szempontjából feleslegesen.

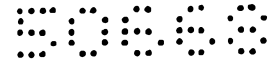
A hagyományos eljárások során fellépő problémákat a sejtkivonatokban lévő, különböző, ismeretlen komponensek jelenléte okozza, amelyek a transzkripció vagy translációs reakció szempontjából feleslegesek, de nehezen távolíthatók el teljes mértékben. Kísérletet végeztek ezért *in vitro* peptidszintézis kivitelezésére kizárólag a translációhoz alapvetően szükséges enzimek és faktorok alkalmazásával [The Journal of Biological Chemistry 252(19), 6889-6894 (1997)].  $\beta$ -Galaktozidáz DNS-irányította szintézise esetében az *E. coli* riboszómákon kívül kizárólag a következő, *E. coli* kivonatból tisztított, 33 komponenst használták a transzkripcióhoz és translációhoz szükséges faktorokként és enzimekként: RNS-polimeráz,  $N^{10}$ -formil-tetrahidrofolát, Met-tRNS<sup>f</sup>-transzformiláz, 20 aminoacil-tRNS-szintetáz, IF-1, IF-2, IF-3, EF-Tu, EF-G, RF-1 és/vagy RF-2, CRP, L és L <sub>$\alpha$</sub> . Ebben a kísérletben azonban a célterméket csak nyomnyi mennyiségben sikerült előállítani, mivel a translációs mechanizmusról csak kevés információ állt rendelkezésre, va-



lamint abban az időben a tisztítási technológia sem volt megfelelő.

Ezt követően Gonza és munkatársai *in vitro* peptidszintézis-rendszert készítettek előre feltöltött aminoacil-tRNS-ekkel (azaz, amelyekhez aktivált aminosavakat kapcsoltak) és tisztított transzlációs faktorokkal [Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 792-798 (1985)]. Másrészről Pavlov és munkatársai is előállítottak egy *in vitro* transzlációs rendszert részlegesen tisztított aminoacil-tRNS-szintetáz keverékével és tisztított transzlációs faktorokkal [Archives of Biochemistry and Biophysics 328(1), 9-16 (1996)]. Egy teljesen tisztított, *in vitro* transzlációs rendszert is készítettek rövid, mesterséges mRNS alkalmazásával [J. Mol. Biol. 273, 389-401 (1997)]. Tudomásunk szerint azonban ez idáig nem számoltak be természetes mRNS-ről sikeresen szintetizált fehérjéről kizárólag az alapvetően fontos enzimeket és faktorokat tartalmazó transzlációs rendszer alkalmazásával. A hagyományos, sejtkivonatokat alkalmazó, *in vitro* peptidszintézis-rendszerek esetében fáradságos módszerek szükségesek a termelődött célpeptidnek a reakciórendszerben lévő fehérjekomponensektől történő izolálására és tisztítására, így a célpeptid csak alacsony hozammal állítható elő.

A következőkben röviden összefoglaljuk a találmányt. A találmány tárgyát képezi egy olyan, hatékony fehérjeszintézis-rendszer, amellyel a peptidok *in vitro* szintézisére kialakított rendszerekben az energiafogyás kérdése



megoldható, és olyan *in vitro* peptidszintézis-rendszer, amelyben a peptidtermék nagy tisztasággal, hatékonyan izolálható a reakciórendszerből.

A találmány tárgyát képező eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására egy DNS-nek RNS-sé történő átírását és az így előállított RNS transzlatálását magában foglaló reakciórendszer, vagy egy RNS *in vitro* transzlatálását magában foglaló reakciórendszer alkalmazásával, amelyben a transzkripció/transzláció reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részét vagy valamennyi elemét egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelöljük, és az anyagpár másik tagját adszorbensként alkalmazzuk a jelölt fehérjekomponens megfogására („capturing”) a transzlatálást követően. Ezen eljárás szerint a transzkripció/transzláció rendszerben sokféle anyagkombináció alkalmazható a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részének vagy valamennyi elemének jelölésére olyan anyaggal párosítva, amely adszorbensként alkalmazható a jelölt fehérjekomponens megfogására.

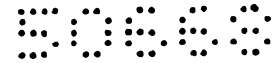
Az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölt fehérjekomponensek egy részét vagy valamennyi elemét képezik a transzkripció vagy transzláció reakció faktoraik és enzimeinek. Ilyen faktorok és enzimek például az iniciációs faktorok, az elongációs faktorok, a terminációs faktorok, az aminoacil-tRNS-szintetáz, a metionil-tRNS-transzformiláz és az RNS-polimeráz.



Az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával je-  
lölt fehérjekomponensek a transzkripció vagy transzlációs  
reakció faktorai és enzimek és más, a reakciórendszer ki-  
alakításához szükséges enzimek. A reakciórendszer kialakí-  
tásához szükséges enzimek, amelyek nem a transzkripció  
vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorok vagy enzi-  
mek, például a reakciórendszerben az energia regenerálásá-  
hoz szükséges enzimek és a transzkripció vagy transzlációs  
reakció során keletkező, szerves pirofoszforsav hidroli-  
zálásához szükséges enzimek.

A találmány szerinti eljárással kívánt helyzetekbe  
beépített nem természetes aminosavakat tartalmazó, nem  
természetes peptidek és peptidszármazékok, például poli-  
szóma-szerkezetek állíthatók elő egy olyan reakciórendszer  
alkalmazásával, amely egy DNS-nek RNS-sé történő átírását  
és a keletkező RNS transzlatálását foglalja magában, vagy  
egy RNS *in vitro* transzlatálását foglalja magában, és amely  
terminációs faktoroktól mentes.

A találmány szerint affinitáskromatográfiában köl-  
csönhatásba lépő, alábbi anyagok bármelyik kombinációja vá-  
lasztható, például egy fehérjének vagy peptidfragmensnek  
egy fémoonal történő kombinációja, egy antigénnek anti-  
testtel történő kombinációja, egy fehérjének egy fehérjével  
vagy peptidfragmenssel történő kombinációja, egy fehérjének  
egy specifikus, alacsony molekulatömegű vegyülettel - amely  
az alábbiak bármelyike: aminosav, DNS, festékek, vitaminok  
és lektinek - történő kombinációja, egy fehérjének egy  
szachariddal történő kombinációja és egy fehérjének vagy



peptidfragmensnek egy ioncserélő gyantával történő kombinációja közül. Többek között hisztidin-címkének fémkeláttal, például nikkel- vagy kobalt-komplexszel történő kombinációja kedvező, amely a fehérje vagy a peptidfragmens és a fémion közötti kötést használja ki.

A találmány szerinti, egymáshoz kapcsolódó anyagok nem korlátozódnak az affinitáskromatográfiában kölcsönhatásba lépő anyagok kombinációjára. Például mágnesesen egymáshoz kapcsolódó anyagok is alkalmazhatók.

A találmány tárgyát képezi továbbá fehérjekomponensek készlete a reakciórendszer számára, amellyel peptid vagy peptidszármazék állítható elő oly módon, hogy egy DNS-t RNS-be írunk át, majd a keletkező RNS-t transzlatáljuk, vagy egy RNS-t *in vitro* transzlatálunk, és a készlete a transzkripció/transzlatációs reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részét vagy valamennyi elemét tartalmazza, és a fehérjekomponensek olyan enzimek vagy faktorok, amelyek egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölhetők. Egy ilyen készletben a fehérjekomponensek a transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorok vagy enzimek és más, a reakciórendszer kialakításához szükséges enzim bármelyike. A transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorok vagy enzimek előnyös példái az iniciációs faktorok, az elongációs faktorok, a terminációs faktorok, az aminoacil-tRNS-szintetáz, a metionil-tRNS-transzformiláz és az RNS-polimeráz. A transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktoroktól vagy enzimektől különböző, a reakciórendszer kialakításához



szükséges enzimek előnyös példái a reakciórendszerben az energia regenerálásához szükséges enzimek és a transzkripció vagy transláció során képződő, szervesetlen pirofoszforsav hidrolizálásához szükséges enzimek. A találmány szerinti fehérjekomponensek készlete tartalmazhat egy adszorbenst az egymással kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölt fehérjekomponens megfogása céljából.

A találmány szerinti fehérjekomponensek készlete egymástól különböző anyagok kombinációját tartalmazhatja, amelyet a reakciórendszer kialakításában részt vevő fehérjekomponensek egy részének vagy valamennyi elemének jelölésére alkalmazunk olyan anyaggal együtt, amelyet a jelölt fehérjekomponensek megfogására alkalmazunk.

A következőkben röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábrán *E. coli* riboszómafrakcióit mutatjuk be szacharóz-sűrűséggradiensben.

A 2. ábrán His-címkével jelölt iniciációs faktorok, elongációs faktorok és terminációs faktorok 12%-os SDS-PAGE-mintázatait mutatjuk be (Coomassie Brilliant Blue festékkel festve).

A 3A ábrán His-címkével jelölt iniciációs faktorok relatív DHFR-aktivitásai láthatók, a 3B ábrán pedig a His-címkével jelölt iniciációs faktorok optimális koncentrációit mutatjuk be, amelyet relatív DHFR-aktivitásban fejezünk ki.



A 4. ábrán His-címkével jelölt terminációs faktorok aktivitásait ábrázoltuk, amelyet fMFL hozamban fejezünk ki.

Az 5A ábrán a His-címkével jelölt SerRS-t tartalmazó eluátum 570 nm-nél mutatott UV-abszorpciójának diagramját mutatjuk be. Az 5B ábrán a His-címkével jelölt SerRS kromatogramja látható.

A 6. ábrán His-címkével jelölt ARS-ek és MTF 12%-os SDS-PAGE mintázatait mutatjuk be.

A 7A ábrán a His-címkével jelölt terminációs faktorok optimális koncentrációit mutatjuk be a találmány szerinti, *in vitro* poli(Phe)-szintézisrendszerben a Phe beépülési szintjével kifejezve. A 7B ábrán a poli(Phe)-szintézisreakciók lefolyását mutatjuk (a Phe beépülésének szintjében kifejezve) a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszerben és S100 extrakciós rendszerben.

A 8A ábrán a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszerrel és S30-rendszerrel szintetizált, [<sup>35</sup>S]Met-et tartalmazó DHFR-termékek 12%-os SDS-PAGE-mintázatai láthatók. A 8B ábrán ezeknek a termékeknek a DHFR-aktivitását ábrázoltuk.

A 9. ábrán a DHFR-szintézisreakciók időbeli lefolyását mutatjuk be a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszerben és az S30-rendszerben.

A 10. ábrán az energiaforrás felhasználásának időbeli lefolyását mutatjuk be a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszerben (jobb) és az S30-rendszerben (bal).

A 11. ábrán egy nem természetes aminosav beépülésének modelljeként a 37. helyzetben valint tartalmazó DHFR képződését tüntettük fel a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszerben.

A 12A ábrán His-címkével jelölt T7RNS-polimerázt tartalmazó eluátum 570 nm-nél mért UV-abszorpciójának diagramját mutatjuk be. A 12B ábrán His-címkével jelölt T7RNS-polimeráz kromatogramja látható.

A 13. ábrán a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszerben képződött, különböző fehérjék SDS-PAGE-mintázatait mutatjuk be.

A 14. ábrán a találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszer transzlációs termékének, a DHFR-nek a tisztaságát mutatjuk be 100 kDa vágású, ultraszűrő membránon és nikkeloszlopontörténő tisztítást követően. Az ábrán a DHFR helyzetét nyíl jelöli.

A következőkben részletesen ismertetjük a találmányt. A találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszer peptid szintetizálására szolgáló reakciórendszer, amelyben egy DNS-t RNS-be írunk át, majd a keletkezett RNS-t transzlatáljuk, vagy egy RNS-t transzlatálunk sejtek alkalmazása nélkül. A leírás szerinti értelemben a "peptid" kifejezésen két vagy több, természetes vagy nem természetes, peptidkötéssel egymáshoz kapcsolt aminosavat értünk, és az oligopeptidek és a polipeptidek is a találmány oltalmi körébe tartoznak. Ide tartoznak továbbá a specifikus háromdimenziós szerkezetű polipeptidekből álló fehérjék. A leírás szerinti értelemben az "RNS" kifejezésbe beleértjük a szin-



tetikus RNS-eket és mRNS-eket is, míg a "DNS" kifejezésbe beleértjük a szintetikus DNS-eket és cDNS-eket is.

A találmány szerinti, *in vitro* szintézisrendszer, amelyben egy DNS-t RNS-be írunk át, majd a keletkezett RNS-t transzlatáljuk, vagy egy RNS-t transzlatálunk, prokarióta vagy eukarióta sejtekben létező reakciórendszer, amely riboszómából, a transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorokból és enzimekből, a reakciórendszer kialakításához szükséges más enzimekből, különböző szubsztrátokból, pufferekből és sókból áll. A találmány szerinti, kedvező hatások olyan reakciórendszerben is elérhetők, amelyet teljes mértékben mesterségesen állítunk elő, azonban a találmány olyan reakciórendszerekben is alkalmazható, amelyekben ezen alkotóelemek közül néhányat sejtkivonaton formájában adunk.

A transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorok és enzimek nem korlátozódnak a prokarióta sejtekben, például *E. coli*-ban, keletkező anyagokra, hanem eukarióta sejtekből származó faktorok és enzimek is alkalmazhatók. Az (1) esetben, amikor egy RNS-t transzlatálunk, ezek a faktorok és enzimek iniciációs faktorok, elongációs faktorok, terminációs faktorok, húsz aminoacil-tRNS-szintetáz, és természetes vagy nem természetes aminosavakhoz kapcsolt tRNS-ek és metionil-tRNS-transzformiláz is beletartozik az *E. coli* eredetű, *in vitro* reakciórendszerbe. A (2) esetben, amikor egy DNS-t RNS-be írunk át, majd a keletkezett RNS-t transzlatáljuk, ezek a faktorok és enzimek az (1) esetnél felsoroltakon kívül még RNS-polimerázt, pél-



dául T7RNS-polimerázt is tartalmaznak. A translációs reakció az előzőekben ismertetett (1) és (2) esetek szerinti reakciórendszerből a terminációs faktorok kiküszöbölésével szabályozható, mint ezt a későbbiekben tárgyaljuk.

A transzkripció vagy translációs reakcióhoz szükséges faktorokon és enzimeken kívüli enzimek például a reakciórendszerben az energia regenerálásához szükséges enzimek, például kreatin-kináz, miokináz és nukleozid-difoszfát-kináz (NDK), valamint a transzkripció vagy translációs reakció során képződő, szervesetlen pirofoszforsav hidrolizálásához szükséges enzimek, például szervesetlen pirofoszfátáz.

A különböző szubsztrátok például természetes aminosavak, nem természetes aminosavak lehetnek, energiaforrásként nukleotid-trifoszfátok, kreatin-foszfát és formilfólsav szolgálhat. A nukleotid-trifoszfátok ATP, GTP, CTP és UTP. Az előzőekben ismertetett, (1) esetben ATP-t és GTP-t, míg az előzőekben ismertetett, (2) esetben ATP-t, GTP-t, CTP-t és UTP-t alkalmazunk.

Pufferként általában kálium-foszfát puffert (pH 7,3) használunk. Az alkalmazott sók általában például kálium-glutamát, ammónium-klorid, magnézium-acetát, kalcium-klorid, putrescin, spermidin és ditiotreitól (DTT). Nyilvánvaló, hogy az előzőekben felsoroltakon kívül más, megfelelő komponensek is alkalmazhatók a reakciórendszerben.

A találmány első jellemzője abban rejlik, hogy a peptid szintézisére szolgáló rendszerben, amelyben egy DNS-t RNS-be írunk át, majd a keletkezett RNS-t transzlatáljuk,



vagy egy RNS-t *in vitro* transzlatálunk, a transzkripció/transzláció reakciórendszer alkotó fehérjekomponensek egy részét vagy valamennyi elemét egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelöljük, és a másik anyagot adszorbensként alkalmazzuk a jelölt fehérjekomponens megfogására a transzlatálást követően. A célpeptid ily módon könnyen elválasztható a reakciórendszer alkotó fehérjekomponensektől, és rendkívül nagy tisztasággal kinyerhető.

Esetenként hisztidin-jelölést alkalmazunk a reakciórendszer alkotó, egyedi fehérjekomponensek, előnyösen a transzkripció/transzláció rendszerhez szükséges faktorok és enzimek előállítására és tisztítására. Hisztidin-címke alkalmazását leírták például EF-Tu [Eur. J. Biochem. 210, 177-183 (1992)], EF-G [Cell 92, 131-139 (1998)] és EF-Ts [Archives of Biochemistry and Biophysics 348, 157-162 (1997)] elongációs faktorok és RF2 terminációs faktor [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8165-8169 (1998)] és fenilalanil-tRNS-szintetáz [Protein Expression and Purification 8, 347-357 (1996)] előállításában és tisztításában. Ezekben az esetekben azonban az előállítást és a tisztítást nem egy *in vitro* peptidszintézis-rendszer kialakításának céljával hajtották végre, hanem csupán az egyedi fehérjék működésének vagy tulajdonságainak vizsgálatára.

Egy transzformánsban, például *E. coli*-ban, gén-expresszióval előállított fehérje vagy fehérjeszármazék elválasztására affinitáskromatográfia, például hisztidin-címkének nikkel-oszloppal történő kombinációja, glutation-S-transzferáznak glutation-Sepharose-gyantaoszloppal törté-



nő kombinációja vagy egy epitóp-címkének ellenanyaggal történő kombinációja alkalmazható. Ilyen esetben a célpeptidbe gyakran beépítenek olyan anyagot, amely szelektíven kötődni képes az adszorpciós oszlophoz. Kereskedelmi forgalomban kapható sejtkivonatokkal kialakított sejtmentes rendszerekben a hisztidin-címkének a célpeptidbe történő beépítésére egy vektor alkalmazható. Ebben az esetben a terméket a célpeptidnek a hisztidin-címkével alkotott fúziós fehérjéje formájában nyerjük ki, amelyet a szintézis után enzimesen el kell hasítani.

Ezen hagyományos eljárásoktól eltérően egymáshoz kapcsolódó anyagpárt viszünk be nem a célpeptidbe, hanem az *in vitro* peptidszintézis-rendszert alkotó fehérjekomponensekbe, amely azon az új felismerésen alapul, hogy a transzkripciós vagy transzlációs reakció akkor is végbe megy, ha a transzkripcióhoz vagy transzlációhoz szükséges faktorokat és enzimeket és más enzimeket az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelöljük.

A találmány szerinti, egymáshoz kapcsolódó anyagpárkombinációt tetszés szerint választhatjuk, amennyiben a transzkripciós vagy transzlációs reakciót nem zavarja. Ezeknek az anyagoknak az egymáshoz való kapcsolódása lehet reverzibilis vagy irreverzibilis, azonban előnyösen irreverzibilisen egymáshoz kapcsolódó anyagokat alkalmazunk. Ebben az esetben a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek ismételten használhatók.



Az egymáshoz kapcsolódó anyagok kombinációja például egy adszorpciós oszlop kombinációja az adszorpciós oszlophoz szelektíven kötődni képes anyaggal. Jellemző anyagok például az affinitáskromatográfiában kölcsönhatásba lépő anyagok. Például fémkomplex, például nikkel- vagy kobaltkomplex az adszorpciós oszlop ligandja, míg hisztidin-címke az adszorpciós oszlophoz szelektíven kötődő anyag. Mindazonáltal különböző ligandoknak hozzájuk szelektíven kapcsolódó anyagokkal való kombinációja alkalmazható, mint ezt a továbbiakban tárgyaljuk, amennyiben a reakciót nem zavarják. A találmány szerinti, affinitáskromatográfiában kölcsönhatásba lépő anyagok kombinációja az alábbiak bármelyike, például egy fehérjének vagy peptidfragmensnek egy fémmionnal történő kombinációja, egy antigénnek ellenanyaggal történő kombinációja, egy fehérjének egy fehérjével vagy peptidfragmenssel történő kombinációja, egy fehérjének egy specifikus, kis molekulatömegű vegyülettel, amely az alábbiak bármelyike: aminosavak, DNS-ek, festékek, vitaminok és lektinek, történő kombinációja, egy fehérjének egy szachariddal történő kombinációja és egy fehérjének vagy peptidfragmensnek egy ioncserélő gyantával történő kombinációja.

A találmány szerinti, egymáshoz kapcsolódó anyagok nem korlátozódnak az affinitáskromatográfiában kölcsönhatásba lépő anyagokra, hanem a céltől függően tetszőlegesen választhatók. Például mágnesesen egymáshoz kapcsolódó anyagok is alkalmazhatók. Ennek egy példjaként mágneses gyönggyel jelölt fehérjének mágnessel történő kombinációja



említhető. Ebben az esetben a peptidszintézis-rendszert alkotó fehérjekomponensek, amelyek mágneses gyöngyökkel egyedileg jelölhetők, mágnessel adszorbeálhatók, és így megfoghatók.

A találmány szerinti adszorbens például oszlop, mátrix, filter vagy gyöngy formájában alkalmazható. Egy másik lehetőségként, adott esetben egy hordozóhoz is köthető. Az adszorbensnek a hordozóhoz történő kötésére megfelelő eszközök az ismert technológiák közül választhatók az adszorbens tulajdonságaitól függően.

A reakciórendszert kialakító fehérjekomponensek egy részének vagy valamennyi elemének jelölésére szolgáló anyagnak az ilyen módon jelölt fehérjekomponensek megfogására szolgáló adszorbensként alkalmazott anyaggal történő kombinációjára nagyon sokféle lehetőség áll rendelkezésre. Egymástól különböző ilyen kombinációk egyetlen reakciórendszerben is alkalmazhatók. Előnyösen az adott fehérjekomponensnek legjobban megfelelő jelölést alkalmazzuk, és az adszorbenst a felhasznált jelölésnek megfelelően választjuk.

Mivel a transzkripció/transzlációs reakciórendszerhez szükséges faktorokat és enzimeket és más enzimeket a találmány szerinti, egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelöljük, a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek rendkívül tiszta állapotban nyerhetők ki, és a reakciórendszer nem szennyeződik semmilyen ismeretlen és felesleges vagy gátló komponenssel. A reakciórendszer ilyen módon kialakítható, és következésképpen a reakció hatékony-



sága nagymértékben fokozódik. Ezen kívül, a célpeptid a szintézis után ezektől a reakciót alkotó elemektől gyorsan elválasztható. A hagyományos sejtmentes rendszerekben a reakció során képződött peptidet extrakcióval tisztítjuk. Nyilvánvalóan minden egyes esetben a reakciótermék fizikai és kémiai tulajdonságaitól függően megfelelő tisztítási módszerre van szükség. Ezzel szemben a találmány szerinti reakciórendszert alkotó komponensek az adszorbens alkalmazásával eltávolíthatók, és a reakciótermék ily módon tisztítható. Elméletileg tehát ugyanaz a tisztítási módszer alkalmazható minden reakciótermékre, függetlenül annak fizikai-kémiai tulajdonságaitól. Az így nyert célpeptid továbbá rendkívül nagy tisztaságú.

A találmány szerint a reakciórendszer komponensei biztosan ellenőrizhetők, amely terminációs faktoroktól mentes reakciórendszer kialakítását teszi lehetővé. A találmány ezen jellemzője következtében különböző típusú poliszóma-szerkezetek alakíthatók ki, ezáltal is szélesítve az *in vitro* peptidszintézis-rendszer felhasználási területét. Konkrétan, peptidből, RNS-ből és riboszómából álló hármas komplexek (poliszóma-szerkezetek) nyerhetők különböző DNS-eknek és RNS-eknek a találmány szerinti, terminációs faktortól mentes, *in vitro* peptidszintézis-rendszerben történő expresszállásával. A poliszóma-szerkezeteknek más komplexektől oly módon történő elválasztásával, hogy célként a peptidet alkalmazzuk, a célpeptid és az RNS egyidejűleg kinyerhető. A terméknek terminációs faktorokkal történő kezelésével a megfelelő RNS nyerhető ki. Ebben az esetben a



peptid, amelyet a riboszómáról le kell hasítani, és a neki megfelelő RNS könnyen izolálható az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölt terminációs faktorokkal történő kezeléssel. A megfelelő DNS például izolált poliszóma-szerkezetből nyerhető RT-PCR-módszerrel [Current Opinion in Biotechnology 9, 534-548 (1998)]. A poliszóma-szerkezetnek EDTA-val történő bontása után az RNS nyerhető ki. Technika-ilag előnyös, hogy egy kiválasztott célpeptidnek megfelelő RNS vagy DNS véletlenszerű expresszióval könnyen kinyerhető. DNS-ek és RNS-ek félig véletlenszerű expressziója sejtmertes rendszerben, nyúleredetű retikulocita reagenskészlet alkalmazásával már ismeretes, azonban ehhez bonyolult eljárások szükségesek (WO 91/05058).

A reakciórendszert alkotó komponensek biztos ellenőrzésével lehetségessé válik nem természetes aminosavakat tartalmazó peptid szintetizálása az *in vitro* peptid-szintézis-rendszerrel. Konkrétan, nem természetes aminosavakat tartalmazó peptidek a találmány szerinti termelési eljárással szintetizálhatók. A reakciórendszerhez nem természetes aminosavval feltöltött és a C-terminális terminációs kodontól eltérő terminációs kodonnak megfelelő szuppresszor-tRNS-t adunk. Ily módon a DNS vagy RNS, amelyet oly módon módosítottunk, hogy a szuppresszor-tRNS-nek megfelelő terminációs kodont építettük be a nem természetes aminosav beépülésének helyére, átíródik és transzlatálódik, így olyan peptidet kapunk, amelybe nem természetes aminosav épült be. Részletesebben kifejtve, a szintézis a következőképpen hajtható végre. A nem természetes aminosav beépítése



érdekében a terminációs kodonok egyikét (UAA, UAG és UGA), például az UGA vagy UAG kodonokat a nyitott leolvasási kereten belül (ORF, "open reading frame") a kívánt helyzetbe beépítjük, és a transzláció befejezésére UAA kodont alkalmazunk. Ezt követően az UGA és/vagy UAG antikodonját hordozó, szuppresszor-tRNS-t készítjük el *in vitro* transzkripcióval, és nem természetes aminosavval töltjük. Ezután a tárlalmány szerinti termelési eljárást hajtjuk végre az RNS transzlatálására ennek az RNS-nek és az előzőekben ismertetett, szuppresszor RNS-nek az alkalmazásával. Ily módon a nem természetes aminosavat helyspecifikus módon beépítve tartalmazó peptid szintetizálható. Egy másik módon a peptid először a megfelelő DNS szintetizálásával, majd ezt követő transzkripciójával és transzlációjával állítható elő.

Az előzőekben ismertetett reakciórendszerből a terminációs faktorok kiküszöbölésével nyerhető reakciórendszer alkalmazásával olyan, peptidből, mRNS-ből és riboszómából álló poliszóma-szerkezetek alakíthatók ki, amelyek egy vagy több nem természetes aminosavat hordoznak a kívánt helyzet(ek)ben. Az ilyen poliszóma-szerkezeteknek az előzőekben ismertetett, egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölt terminációs faktorokkal történő kezelésével a riboszómáról lehasított peptid és a neki megfelelő RNS könnyen izolálható. A megfelelő DNS a poliszóma-szerkezetből például RT-PCR-rel nyerhető [Current Opinion in Biotechnology 9, 534-548 (1998)]. Ennek a poliszóma-szerkezetnek EDTA-val történő bontásával az RNS is kinyerhető.



Ezek szerint a találmány szerinti eljárással előállított peptidszármazékok poliszóma-szerkezetek és kívánt helyzetekben nem természetes aminosavakat tartalmazó nem természetes peptidek is lehetnek.

A találmány szerinti, peptid vagy peptidszármazék előállítására szolgáló eljárás "batch" rendszer alkalmazásával végezhető a hagyományos módon. Egy lehetőségként különböző, már ismert vagy szokásos eljárás hajtható végre, például "flow" (folyamatos) eljárás, ahol az anyagokat, a szubsztrátokat is beleértve, folyamatosan adagoljuk vagy a reakcióterméket adott esetben kivonjuk, vagy dialízis eljárás [lásd például, japán szabadalmi bejelentés 110236/1995, Tanpakushitsu, Kakusan, Koso (Proteins, Nucleic acids and enzymes) 44(4), 598-605 (1999), Current Opinion in Biotechnology 9, 534-548 (1998)].

A találmányt a következő példák segítségével tárgyaljuk részletesen. Nyilvánvaló, hogy a találmány nem csak ezekre korlátozódik.

1. A találmány szerint előállítható peptidek és peptidszármazékok

A találmány szerinti termelési eljárással bármilyen típusú, természetes és nem természetes peptid előállítható. A találmány szerinti eljárás alkalmazása tehát lehetővé teszi olyan peptidek előállítását, amelyek a gazdasejtekben termelődő proteázokkal, például dihidrofolát-reduktázzal (DHFR), lizozimmel (amely  $\lambda$ -fágban keletkezik) és zöld fluoreszcens fehérjékkel (GFP, "green fluorescent protein")



emészthetők, valamint a gazdasejtre toxikus peptidek. A leírás szerinti értelemben a "természetes peptidek" kifejezésen olyan peptidet értünk, amely a genetikai kódban kódolt, hús természetes aminosavból áll, míg az egyéb  $\alpha$ -aminosavakat tartalmazó peptideket "nem természetes peptideknek" nevezzük.

Továbbá peptidből, RNS-ből és riboszómából álló hármas komplexek (poliszóma-szerkezetek) könnyen előállíthatók terminációs faktortól mentes reakciórendszerben a találmány szerinti termelési eljárásban.

A találmány szerinti eljárással előállítható, nem természetes peptidek például módosított természetes aminosavakat, módosított semleges aminosavakat, módosított savas aminosavakat, módosított bázisos aminosavakat, nem  $\alpha$ -aminosavakat tartalmazó peptidek,  $\phi, \phi$ -szög eltolódást tartalmazó aminosavakból álló peptidek, valamint az alábbi funkciós csoportok bármelyikét tartalmazó aminosavakból álló peptidek, nitro-, amidin-, hidroxilamin-, kinonvegyületek, alifás vegyületek, és ciklikus és telítetlen hidrokartil-csoportok. Ismertek már eljárások ilyen peptidek szintetizálására sejtmentes fehérjeszintézis-rendszerekben sejtkivonatok alkalmazásával (lásd, pl. JP-W-Hei-4-504651/WO90/05785). Ezeknek a nem természetes peptideknek egy előnyös példajaként a megfelelő helyzetben védett ciszteint tartalmazó DHFR említhető, amely a természetben nem fordul elő. Megemlíthetők továbbá a kívánt helyzetben nem természetes aminosavat, például p-fluorfenilalanint, p-nitro-fenilalanint vagy homofenilalanint



tartalmazó peptidek. Ismeretes, hogy olyan  $\beta$ -laktamáz variánsok, amelyekbe ezt a három nem természetes aminosavat építették be a 66-os helyzetű fenilalanin helyére, megfelelő enzimaktivitást mutat [Bio Industry 8, 749-759 (1991)]. Ezek a nem természetes peptidek a találmány szerinti eljárással szintén könnyen előállíthatók.

## 2. Riboszóma

A riboszóma az a részecske, ahol a peptidek szintetizálódnak. Az mRNS-hez kötődik, és az aminoacil-tRNS-t az A-helyzetbe és a formilmethionil-tRNS-t vagy peptidil-tRNS-t a P-helyzetbe irányítja, és így kialakítja a peptidkötést [Science 289, 920-930 (2000)]. A találmány szerint bármilyen riboszóma alkalmazható az eredetétől függetlenül, amennyiben az előzőekben ismertetett funkcióval rendelkezik. Általában *E. coli* eredetű riboszómát használunk, de eukarióta eredetű riboszómák is alkalmazhatók. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű riboszómák alkalmazhatók, például *E. coli* A19 vagy MRE600 jelű törzséből nyert riboszómák.

## 3. A találmány szerinti, in vitro peptidszintézisrendszerben alkalmazandó, transzkripcióhoz vagy transzlációhoz szükséges faktorok és enzimek

### (3-1) Iniciációs faktorok

Az iniciációs faktorok olyan faktorokat jelentenek, amelyek a peptidszintézis folyamatában alapvetően fontosak az iniciációs komplex kialakításához, vagy jelentős mértékben elősegítik azt. Az IF1, az IF2 és az IF3 *E. coliban* képződő iniciációs faktorok [Biochemistry 29, 5881-5889



(1990)]. Az IF3 a riboszómák disszociációját okozza, amelyek így 30S és 50S alegységekre esnek szét (azaz ez a lépés a transzláció megkezdéséhez szükséges), és megakadályozza a formilmetionin-tRNS-től eltérő, más tRNS-ek beépülését a P-helyzetbe az iniciációs komplex kialakulásának ezen lépésében. Az IF2 a formilmetionin-tRNS-hez kötődik, és a formilmetionin-tRNS-t a 30S alegység P-helyzetéhez szállítja, amivel kialakul az iniciációs komplex. Az IF1 az IF2 és az IF3 működését serkenti. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű iniciációs faktorokat alkalmazunk, például *E. coli* K12 törzséből nyerhetőket, azonban eukarióta eredetű iniciációs faktorok is alkalmazhatók.

### (3-2) Elongációs faktorok

Az EF-Tu elongációs faktornak két típusa van, a GTP- és a GDP-típusok. A GTP-típusú EF-Tu az aminoacil-tRNS-hez kötődik és a riboszóma A-helyzetébe irányítja. Amikor az EF-Tu felszabadul a riboszómáról, a GTP GDP-vé hidrolizálódik [EMBO J. 17, 7490-7497 (1998)]. Egy másik elongációs faktor, az EF-Ts kötődik a GDP-típusú EF-Tu-hoz és GTP-típussá alakulását indukálja [Archives of Biochemistry and Biophysics 348, 157-162 (1997)]. Egy következő elongációs faktor, az EF-G a peptidkötés kialakulását követően a transzlokációt segíti elő a peptidlánc hosszabbodásának folyamatában [Nature Structural Biology 5, 643-647 (1999); FEMS Microbiology Reviews 23, 317-333 (1999)]. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű elongációs faktorokat alkalmazunk, például *E. coli* K12 jelű törzséből nyerhetőket,



azonban eukarióta eredetű elongációs faktorok is alkalmazhatók.

### (3-3) Terminációs faktorok

A terminációs faktorok alapvetően fontosak a fehérjeszintézis befejezéséhez, a transzlatált peptidlánc felszabadulásához és a riboszómának a következő mRNS-transzláció megkezdéséhez történő helyreállításához. Ha a fehérje terminációs faktortól mentes reakciórendszerben szintetizálódik, a reakció megáll a terminációs kodon előtt, és így stabil, riboszómából, peptidből és mRNS-ből álló hármaskomplex (poliszóma-szerkezet) alakítható ki. A peptidláncba nem természetes aminosav a reakciórendszerből akár az RF1, akár az RF2 kivonásával építhető be. Vagyis, nem természetes aminosav nagy hatékonysággal építhető be az UAG kodonba, ha az RF1-et eltávolítjuk, vagy az UGA kodonba, ha az RF2-t távolítjuk el.

Ha a terminációs kodon (UAA, UAG vagy UGA) a riboszóma A-helyzeténél található, az RF1 és RF2 terminációs faktorok az A-helyzethez kapcsolódnak, és elősegítik a peptidlánc leválását a P-helyzetben lévő peptidil-tRNS-ről. Az RF1 a terminációs kodonok közül az UAA és UAG kodonokat, míg az RF2 az UAA és UGA kodonokat ismeri fel. A harmadik terminációs faktor, az RF3, az RF1 és RF2 riboszómáról történő disszociációját segíti elő a peptidlánc RF1 és RF2 hatására bekövetkező leválását követően. A riboszóma helyreállító faktor (RRF, "ribosome recycling factor") váltja ki a P-helyzetben maradó tRNS disszociációját a fehérjeszintézis után, majd a riboszóma helyreállítását a következő fe-



hérjeszintézishez. A találmány szerinti értelemben az RRF-et a terminációs faktorok közé soroljuk. Az RF1, RF2, RF3 és RRF terminációs faktorok működéséről a következő folyóiratokban található ismertetés: EMBO J. 16, 4126-4133 (1997) és EMBO J. 16, 4134-4141 (1997). A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű terminációs faktorokat alkalmazunk, például *E. coli* K12 jelű törzséből nyerhetőket, azonban eukarióta eredetű terminációs faktorok is alkalmazhatók.

#### (3-4) Aminoacil-tRNS-szintetáz

Az aminoacil-tRNS-szintetáz enzim ATP jelenlétében az aminosavat a tRNS-hez köti kovalensen, és így aminoacil-tRNS-t szintetizál [RNA 3, 954-960 (1997), Tanpakushitsu, Kakusan, Koso (Proteins, Nucleic Acids and Enzymes) 39, 1215-1225 (1994)]. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű aminoacil-tRNS-szintetázt alkalmazunk, például *E. coli* K12 jelű törzséből nyerhetőt, azonban eukarióta eredetű aminoacil-tRNS-szintetázok is alkalmazhatók.

#### (3-5) Metionil-tRNS-transzformiláz

Az N-formilmetionin (fMet), amely a metionin végen az aminocsoporthoz kapcsolva egy formil-csoportot hordoz, a prokarióta fehérjeszintézis-rendszerben kezdő aminosav. Ezt a formil-csoportot a metionil-tRNS-ben a metionil-tRNS-transzformiláz (MTF) kapcsolja a metioninhez. Konkrétan, a metionil-tRNS-transzformiláz viszi át az N<sup>10</sup>-formil-tetrahydrofolátban lévő formil-csoportot az iniciációs kodonnak megfelelő metionil-tRNS N-terminális végére, amellyel a formilmetionin-tRNS alakul ki [Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 96, 875-880 (1999)]. Az ily módon hozzákapcsolt formil-csoportot az IF2 ismeri fel, és a fehérjeszintézis iniciációs szignáljaként működik. Az MTF az eukarióták citoplazmás szintézisrendszerében nem fordul elő, azonban az eukarióta mitokondriumban és kloroplasztiszban lévő szintézisrendszerekben megtalálható. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű metionil-tRNS-transzformilázt alkalmazunk, például *E. coli* K12 jelű törzséből nyerhető.

#### (3-6) RNS-polimeráz

Jól ismert, hogy az RNS-polimeráz, amely enzim a DNS-szekvenciát RNS-be írja át, különböző szervezetekben is előfordul. Példaként megemlíthető a T7-fágból származó T7RNS-polimeráz, amely egy specifikus, T7-promóternek nevezett DNS-szekvenciához kötődő enzim, amely az 5'-irányú DNS-szekvenciát RNS-be írja át. A T7RNS-polimeráz N-terminális végéhez His-címkét kapcsoltunk, és fúziós fehérjeként nagy mennyiségben expresszáltuk *E. coli* BL21 törzsében. Az expressziós terméket affinitáskromatográfiával tisztítottuk nikkell-oszlopon. Az így kapott, His-címkével ellátott T7RNS-polimerázt még senki nem állította elő. A T7RNS-polimerázon kívül számos más RNS-polimeráz alkalmazható a találmány szerint. Például, kereskedelmi forgalomban kapható T3RNS-polimeráz és SP6RNS-polimeráz is alkalmazható.



(3-7) Nem természetes aminosavhoz kapcsolt aminoacil-tRNS

A fehérjékbe a természetes fehérjékben előforduló 20 aminosavtól eltérő aminosav beépítésével a fehérjékkel kapcsolatos működések javíthatók, vagy új, hasznos működések vagy jellemzők alakíthatók ki a fehérjében. Nem természetes aminosavhoz kapcsolt aminoacil-tRNS 3'-végen CA-ban hiányos szuppresszor-tRNS szintetizálásával állítható elő *in vitro* transzkripció útján és kémiaiilag szintetizált, nem természetes aminosavat hordozó aminoacil-pCpA-hoz történő kapcsolásával RNS-ligáz útján [Baio Saiensu to Indasutori (Bioscience and Industry) 47, 16-24 (1989)].

(4) A találmány szerinti, *in vitro* peptidszintézis-rendszerben alkalmazandó, a reakciórendszer kialakításához szükséges, a transzkripcióhoz vagy translációhoz szükséges faktoroktól és enzimektől különböző enzimek

(4-1) A reakciórendszerben az energia regenerálásához szükséges enzimek

Ilyen típusú enzimek például a kreatin-kináz, a miokináz és a nukleozid-difoszfátkináz (NDK). A kreatin-kináz, amelyet kreatin-foszfokináznak (CPK) is neveznek, az ATP-ről egy foszfát-csoportnak kreatinra történő átvitelét katalizálja. A miokináz, amelyet adenilát-kináznak is neveznek, az ATP-nek ADP-ből történő regenerációjában, és ezzel párhuzamosan az AMP képzésében vesz részt. Az NDK  $\gamma$ -foszfát-csoport átvitelét katalizálja nukleozid-difoszfát és nukleozid-trifoszfát között. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű enzimeket alkalmazunk, például *E. coli*

K12 jelű törzséből nyerhetőket, azonban eukarióta eredetű enzimek alkalmazása is lehetséges.

(4-2) A transzkripció vagy transláció reakció során keletkező, szervesetlen pirofoszforsav hidrolizálásához szükséges enzimek

Az ilyen típusú enzimekre példaként a szervesetlen pirofoszfátáz említhető. A találmány szerint előnyösen *E. coli* eredetű enzimeket alkalmazunk, például *E. coli* K12 jelű törzséből nyerhetőket, azonban eukarióta eredetű enzimek alkalmazása is lehetséges.

A reakciórendszer előző (3) és (4) pontoknál ismertetett alkotóelemei közül a fehérjekomponensek expresszálnak legnagyobb mennyiségben *E. coliban* (például a kereskedelmi forgalomban kapható BL21 jelű törzsben) az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával az N- vagy a C-terminális végen jelölt, fúziós fehérjék formájában (például His-címkével ellátott fehérjék), amit a következőkben részletesebben tárgyalunk. Az ily módon expresszált fehérjék a másik anyagot tartalmazó adszorbenshez kötött nikkeloszlopon tisztíthatók, például gyors fehérje-folyadék-kromatográfiával (FPLC, "fast protein liquid chromatography"), majd a reakciórendszerhez alkalmazzuk. *E. coli*n kívül ezek a fehérjék állati sejtekben, élesztőkben, *Bacillus subtilis*ben vagy hasonlókban expresszálhatók. Egy másik lehetőségként ezek a fehérjék *in vitro* peptid-szintézis-rendszerben állíthatók elő.

(5) Jelölés és adszorbens, azaz az egymáshoz kapcsolódó anyagpár

A találmány szerinti, az előző, (3) és (4) pontokban ismertetett reakciórendszert alkotó valamennyi fehérjekomponenst vagy egy részüket egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelöljük, és az ily módon jelölt fehérjekomponenseket a másik anyagnak adszorbensként történő alkalmazásával fogjuk meg, és ily módon izoláljuk a reakciórendszerben képződött célpeptidet. Az egymáshoz kapcsolódó anyagpárok jellemző példái az affinitáskromatográfiában kölcsönhatásba lépő anyagok. A találmány szerint azonban bármilyen, egymáshoz kapcsolódó anyagpár alkalmazható az affinitáskromatográfiában kölcsönhatásba lépő anyagokra történő korlátozás nélkül, amennyiben ezek az anyagok a fehérjekomponensek megfogására alkalmasak.

A fehérjék bizonyos anyagokkal történő, specifikus kölcsönhatások révén fiziológiai hatásokat fejtenek ki. Azt az adszorpciós kromatográfiát, amikor egy fehérje és egy bizonyos anyag (ligand) közötti specifikus kölcsönhatást (affinitás) használjuk ki, affinitáskromatográfiának nevezük. Specifikusan egymáshoz kapcsolódó anyagok kombinációjára példa egy fehérjének vagy peptidfragmensnek fémionnal vagy kelát-vegyülettel, egy antigénnek ellenanyaggal, egy citokinnek vagy hormonnak receptorral és egy enzimnek szubsztráttal vagy inhibitorral történő kombinációja. Továbbá specifikus aminosavak, DNS-ek, festékek, vitaminok, lektinek és hasonlóak kölcsönösen kötődnek a feljük affinitást mutató fehérjékhez.



Az ilyen kombinációkból az egyik anyagot ligandként egy hordozóhoz vagy tartóhoz rögzítjük, amellyel így egy adszorbenst alakítunk ki. Ezután a másik anyaggal jelölt vegyületet (a találmány szerint a reakciórendszert alkotó fehérjekomponenseket) keresztülcselezünk. A jelölés specifikusan kötődik a ligandhoz. Az ilyen specifikus kötődésen alapuló affinitáskromatográfiát fehérjék tisztítására széles körben alkalmazzák. Különböző cégektől sokféle hordozó szerezhető be, amelyek ezt a módszert könnyen alkalmazhatóvá teszik. Antigén-ellenanyag-reakción alapuló fehérjetisztítás során például ismert szerkezetű antigéndeterminánsnak (epitóp) az epitópra specifikus ellenanyaggal történő kombinációja használható. Ehhez a módszerhez vektorok és adszorbensek különböző kombinációi szerezhetők be. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint ilyen, affinitáskromatográfiában használt, egymáshoz kapcsolódó anyagok kombinációját alkalmazzuk. A találmány szerint alkalmazandó, jelölt fehérjekomponensek készítésénél a jelölés használható fel a tisztításnál. A fehérjekomponensek egyidejűleg több jelölést is tartalmazhatnak. Ebben az esetben a termelési folyamat során a tisztításban alkalmazott jelölés eltávolítható, míg más jelölések pedig az *in vitro* peptid-szintézis-rendszerben képződő céltermék elválasztására használhatók.

A következőkben a találmány szerinti megvalósítási módokat mutatjuk be az egymáshoz kapcsolódó anyagok kombinációjának néhány példáján keresztül. Nyilvánvaló, hogy a találmány nem korlátozódik ezekre a példákra.



(5-1) Eljárás fehérjének vagy peptidfragmensnek fém-ionhoz vagy kelátképző vegyülethez történő kötődésének alkalmazásával

A: His-címke fémkomplexszel, például nikkel- vagy kobalt-komplexszel

Fehérjék tisztítására általánosan használt módszer His-címkének fémkomplexhez, például nikkel- vagy kobalt-komplexhez történő kötődése. Konkrétan, az expresszálandó DNS-hez His-címkét kapcsolunk, amellyel egy His-címkét hordozó fúziós fehérje keletkezik. Ezt a fúziós fehérjét azután például nikkel-, kobalt-, réz-, vagy cink-komplexet tartalmazó oszlopon megfogjuk és tisztítjuk. Ezután a fehérje az oszlopról imidazolt tartalmazó eluenssel mosható le [lásd, például Tanpakushitsu Jikken Noto (Protein Experiment Note) (I) 5:1 fejezet, 139. His-Tag Tanpakushitsu no Hatugen to Seisei (Expression and Purification of His-Tag Protein), Yasumitsu and Wakui, kiad.: Yodosha; Bornhorst, J. A. és Falke, J. J., "Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags", Methods in Enzymology 326, 245-254 (2000); Proteins 41, 144-53 (2000); FEMS Microbiol. Lett. 188, 147-51 (2000); és J. Bacteriol. 182, 4304-9 (2000)]. Ezek a kombinációk a találmány szerint alkalmazhatók.

His-címkével jelölt fehérjekomponenseket kódoló gének expresszálására például *E. coli* [Van Dyke, M. W., Siritto, M. és Sawadogo, M., Gene 111, 95 (1992)], *Saccharomyces cerevisiae* [Kaslow, D. C. és Shiloach, J., Bio/Technology 12, 494 (1994)], emlőseredetű sejtek [Janknecht, R. és



Nordheim, A., *Gene* 121, 321 (1992)] és baculovírussal fertőzött rovarsejtek alkalmazhatók [Kuusinen, A., Arvola, M., Oker-Blom, C. és Keinanen, K., *Eur. J. Biochem.* 233, 720 (1995)]. Ezek a sejtek adott esetben a találmány szerint alkalmazhatók.

A következő módszer vázlatosan egy példát mutat be His-címkével jelölt fehérjekomponens tisztítására His-címke és nikkell-oszlop alkalmazásával. Ennek az eljárásnak számos változata ismeretes, és ezek közül kiválasztható a legmegfelelőbb.

1. Géntechnológiai úton hat hisztidin aminosavból álló His-címkét kapcsolunk a célfehérje N-terminális végéhez, így egy fúziós fehérjét kapunk.

2. A címkével jelölt fehérjét expresszáló sejteket jégen történő szonikálással szétzúzzuk, az így feltárt sejteket töltőpufferben szuszpendáljuk (300 mM nátrium-klorid, 50 mM nátrium-dihidrogénfoszfát, pH 8,0).

3. A sejttörmelékét centrifugáljuk (30000g, 4°C, 30 perc).

4. A felülúszóhoz előzetesen jéghideg töltőpufferben egyensúlyba hozott 50%-os Ni<sup>2+</sup>-NTA-izsapat (Qiagen) adunk, majd egy órán keresztül 4°C-on kevertetjük.

5. A gyantát az oszlopra töltjük. Az oszlopot 20 oszloptérfogatnyi töltőpufferrel mossuk 4°C-on.

6. Az oszlopot 20 oszloptérfogatnyi töltőpufferrel (amely 10 mM imidazolt tartalmaz, pH 8,0) mossuk 4°C-on.



7. A célfehérjét 20 oszloptérfogatnyi töltőpufferrel mossuk le a töltőpufferben 10 mM és 250 mM közötti imidazol koncentrációgradienssel. Egy milliliter térfogatú frakciókat gyűjtünk, és a célfehérjét SDS-PAGE-val azonosítjuk.

#### B. Tioeredoxin fenilarzin-oxiddal (PAO)

Ezen módszer szerint a célfehérjének tioeredoxinnal alkotott fúziós fehérjéjét képezzük, és rögzített PAO-t tartalmazó agarózgélen (*ThioBond<sup>TM</sup>* gyanta, Invitrogen) adszorbeáltatjuk, kihasználva a tioeredoxinnak PAO-hoz történő kötődését, majd  $\beta$ -merkaptoetanollal ( $\beta$ -ME) történő lemosás következik [Alejo, A., Yanez, R. J., Rodriguez, J. M., Vinuela, E. és Salas, M. L., "African Swine Fever Virus trans-Phenyltransferase", *The Journal of Biological Chemistry* 272, 9417-9423 (1997)]. Ez a módszer szintén alkalmazható a találmány szerint.

A következő módszer vázlatosan ismerteti a fehérjék tisztításának ezen eljárás szerinti folyamatát.

1. Transzformált sejtek (*E. coli*/pTrxFus, Invitrogen) egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét 20-szorosára hígítjuk 100  $\mu$ g/ml (végkoncentráció) ampicillintartalmú RM-tápközeggel (0,6% dinátrium-hidrogénfoszfát, 0,3% kálium-dihidrogénfoszfát, 0,05% nátrium-klorid, 0,1% ammónium-klorid, 2% casamino acid, 0,0095% magnézium-klorid), és 30°C-on inkubáljuk.



2. Az  $A_{550}=0,5$  értékig történő inkubálást követően 100  $\mu\text{g/ml}$  (végkoncentráció) triptofánt adunk a fúziós fehérje expressziójának indukálása érdekében, majd 34°C-on, további két órán keresztül folytatjuk az inkubálást.

3. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük. A sejttöledéket 5 ml futtató pufferben szuszpendáljuk [100 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM nátrium-klorid, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -merkaptoetanol], majd a sejteket szonikálással szétzúzzuk.

4. A sejtszuszpenziót centrifugáljuk (10000g, 15 perc) és a felülúszót összegyűjtjük.

5. A felülúszót 2 ml *ThioBond*<sup>TM</sup> gyantával inkubáljuk 4°C-on, 60 percen keresztül, hogy a felülúszóban lévő fúziós fehérje a gyantához kötődjön.

6. A keveréket egy oszlopra töltjük, és 30 oszloptérfogatnyi futtató pufferrel mossuk [100 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM nátrium-klorid, 1 mM EDTA, 20 mM  $\beta$ -merkaptoetanol].

7. A célfehérjét futtató pufferrel mossuk le  $\beta$ -merkaptoetanol-gradienssel.

(5-2) Eljárás antigén vagy antigénfragmens (epitóp-címke) ellenanyaghoz történő kötődésének alkalmazásával

A. T7-címke és T7-címkére specifikus, monoklonális ellenanyag

A T7-címke a T7-fágból származó 10-es jelű gén 11 aminosavából álló szekvencia. A T7-címkének a vele szemben termelt ellenanyaggal alkotott kombinációját alkalmazzuk fehérje tisztítására. Konkrétan, a folyamat során a T7-címkét kódoló DNS-szekvenciát egy génhez kapcsoljuk, majd expresszáljuk a célfehérjét, és az így kapott, T7-címkével



fuzionált fehérjét a T7-címkére specifikus, monoklonális ellenanyagként történő alkalmazásával fogjuk meg és tisztítjuk. Az adszorbens például a kereskedelmi forgalomban kapható *T7-Tag Antibody Agarose* (T7-címkére specifikus ellenanyagot tartalmazó agaróz) lehet (Novagen). Az elúcióhoz citromsavat használunk. Ez a kombináció is alkalmazható a találmány szerint. Lásd, Deora, R, Tseng, T. és Misra, T. K., "Alternative Transcription Factor  $\sigma^{SB}$  of *Staphylococcus aureus*: Characterization and Role in Transcription of the Global Regulatory Locus *sa*.", *Journal of Bacteriology* 179, 6355-6359 (1997).

A következő módszer vázlatosan ismerteti a T7-címkével jelölt fehérjekomponens tisztításának ezen eljárását. Ennek a módszernek számos változata ismert, és ezek közül kiválasztható a legmegfelelőbb.

1. *E. coli*/pET-vektor (Novagen) transzformált sejteket 20  $\mu\text{g/ml}$  kloramfenikolt és 30  $\mu\text{g/ml}$  kanamicint tartalmazó 2xYT-tápközegben szaporítunk (1,6% Bacto Trypton, 1% élesztőkivonat, 0,5% nátrium-klorid, 0,4% glükóz).

2. A sejteket  $A_{600}=0,6$  értékig inkubáljuk, majd a célfehérje expressziójának indukálása érdekében IPTG-t adunk hozzájuk, majd további két órán keresztül folytatjuk az inkubálást.

3. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük. Az üledéket 10 ml, jéghideg, T7-címkét kötő/mosó pufferben szuszpendáljuk [4,29 mM dinátrium-hidrogénfoszfát, 1,47 mM kálium-dihidrogénfoszfát, 2,7 mM kálium-klorid, 137 mM nátrium-klorid, 1% Tween-20, 0,02% nátrium-azid (pH 7,3)].



4. A sejteket jégen szonikálással szétzúzzuk, amíg a szuszpenzió már nem viszkózus.

5. A sejttörmeléket centrifugálással távolítjuk el (39000 g, 20 perc). A felülúszót 0,45 µm filtermembránon szűrjük át.

6. A sejtkivonatot T7-címkét kötő/mosó pufferrel előzetesen egyensúlyba hozott *T7-Tag Antibody Agarose* oszlopra (Novagen) töltjük. Az oszlopot ugyanezzel a pufferrel moszuk a nem specifikusan kötődött fehérjék eltávolítása céljából.

7. A célfehérjét elúciós pufferrel oldjuk le [0,1 M citromsav (pH 2,2)].

B. Eljárás FLAG-peptidcímkeknek (*FLAG peptide tag<sup>TM</sup>*, Sigma) FLAG-ellenanyaghoz (*anti-FLAG antibody<sup>TM</sup>*, Sigma) történő kötődésének alkalmazásával

A FLAG-peptidcímket (*FLAG peptide tag<sup>TM</sup>*, Sigma), amely 8 aminosavból álló peptid, mint úgynevezett epitópcímket alkalmazzuk a vele szemben termelt ellenanyaggal együtt fehérjék tisztítására. Konkrétan, elkészítjük az N-terminális végén a FLAG-peptidcímket hordozó fehérjét, majd FLAG-ellenanyagot tartalmazó oszlopon megfogjuk. A FLAG-peptidcímket az elúció során alkalmazzuk. Lásd, Woodring, P. J. és Garrison, J. C., "Expression, Purification and Regulation of Two Isoforms of the Inositol 1,4,5-Triphosphate 3-Kinase", *The Journal of Biological Chemistry* 272, 30447-30454 (1997).

A következő módszer vázlatosan ismerteti ezt az eljárást, amely megfelelő módon módosítható.

1. A célfehérjét expresszáló sejteket [gazda: B31-sejt (Rat-1 fibroblaszt-sejtvonal), vektor: pDouble-Trouble (pDT) emlőseredetű expressziós vektor] centrifugálással összegyűjtjük, és 8 ml, hipotóniás, proteáz-inhibitorokat (10 µg/ml calpain inhibitor I és II, 100 µg/ml Pefabloc, 2,5 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml bacitracin, 20 µg/ml benzamidin) tartalmazó lízis pufferben homogenizáljuk.

2. A sejttörmelék és a nukleinsavak eltávolítása érdekében centrifugáljuk (2000 g), és a felülúszót összegyűjtjük.

3. Még egyszer centrifugáljuk, és az így kapott sejt-kivonatot FLAG-ellenanyagoszlop 1 ml-éhez adjuk. Az oszlopot 35 ml TBSC-pufferrel mossuk [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM nátrium-klorid, 0,1% (tf/tf) CHAPS].

4. A célfehérjét 5 ml, 200 µg/ml FLAG-peptidet tartalmazó TBSC-pufferrel mossuk le.

#### C. A-fehérje és IgG

Ezen módszer szerint *Staphylococcus* eredetű A-fehérjének (SPA) a vele szemben termelt IgG-ellenanyaghoz történő kötődését használjuk fel. A célfehérjének SPA-val képzett fúziós fehérjéjét IgG Sepharose oszlopon fogjuk meg. Az elúcióhoz alacsony pH értékű puffert alkalmazunk. Lásd, Nilsson, B. és Abrahmsen, L., "Fusion to Staphylococcal Protein A", *Methods in Enzymology* 185, 144-161 (1990).

A következő módszer vázlatosan ismerteti ezt az eljárást, amely megfelelő módon módosítható.

1. A transzformált sejtek egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét [gazda: *E. coli* vagy *S. aureus*, vektor: pRIT20- vagy pRIT30-sorozatok] 25 ml LB-tápközeghez adjuk (LB-tápközeg + 0,1% (s/tf) glükóz, 250 mg/l ampicillin), és 37°C-on 4 órán keresztül inkubáljuk.

2. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük (10000 g, 5°C, 20 min), és a felülúszót 0,45 µm filtermembránon szűrjük át.

3. A szűrletet TST-vel [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM nátrium-klorid, 0,05% (tf/tf) Tween 20] előzetesen egyensúlyba hozott *IgG Sepharose* oszlop 5 ml-éhez adjuk.

4. Az oszlopot kétszer egymás után 15-15 ml TST-vel mossuk, majd 5 ml 1 mM ammónium-acetáttal.

5. A fehérjét 1 ml 0,5 M ammónium-acetáttal (pH 3,3) oldjuk le.

#### D. Fehérje és monoklonális ellenanyag

Ismert egy eljárás ciklikus nukleotiddal zárt (CNG, "cyclic nucleotide-gated") csatorna - amely fehérje marha retinájából származik - tisztítására PMc 6E7 monoklonális ellenanyag alkalmazásával (az α-alegység N-terminális doménje: 63-kDa polipeptid) [Molday, R. S. és Molday, L. L., "Purification, Characterization and Reconstitution of Cyclic Nucleotide-Gated Channels", *Methods in Enzymology* 294, 246-260 (1999)]. A monoklonális ellenanyagot rákötve tartalmazó *Sepharose 2B* oszlopot (Pharmacia) használjuk adszorbensként. A célfehérje lemosására 6E7-peptidet alkalma-



zunk, amely a monoklonális ellenanyaghoz kompetitíven kötődő peptid, és az aminosavszekvenciája Ser-Asn-Lys-Glu-Gln-Glu-Pro-Lys-Glu-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys. Ez a kombináció is alkalmazható a találmány szerint.

A következő módszer marharetinából származó fehérjének monoklonális ellenanyaggal történő tisztítására mutat be egy példát.

1. Marharetina homogenizátumából összegyűjtjük a pálcikák külső szegmensének (ROS, "rod outer segment") frakcióját 30-50% szacharóz-sűrűséggradiens centrifugálással [20 mM Tris-acetát (pH 7,4), 10 mM glükóz, 1 mM magnézium-klorid; 82500 g, 4°C 45 perc].

2. A ROS-frakciót 5 térfogatnyi homogenizáló pufferben hígítjuk [20% (s/TF) szacharóz, 20 mM Tris-acetát (pH 7,4), 10 mM glükóz, 1 mM magnézium-klorid] és centrifugáljuk (20000 g, 4°C, 20 perc).

3. A ROS-t tartalmazó üledéket 8 ml homogenizáló pufferben újra szuszpendáljuk, és így kapjuk a nyers ROS-kivonatot.

4. A ROS-t 10 térfogatnyi hipotóniás lízis pufferben szuszpendáljuk [10 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT] és centrifugáljuk (20000 g, 10 min).

5. A membránt tartalmazó üledéket ugyanabban a pufferben szuszpendáljuk és kétszer mossuk.

6. Az üledéket 10 mM HEPES-KOH (pH 7,4) pufferben szuszpendáljuk.

7. A ROS-membránt CHAPS {3-[3-(Cholamidopropil)-dimetilammónio]-1-propán-szulfonát} szolubilizációs pufferhez adjuk [10 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM kalcium-klorid, 0,15 M kálium-klorid, 18 mM CHAPS, 2 mg/ml azolektin (szójabab foszfatidil-kolin IV-S típus, Sigma) proteáz inhibitor (0,1 mM diizopropil-fluorofoszfát, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 µg/ pepsztatin vagy 20 µM Pefabloc SC)] és lassan kevertetjük.

8. A sejttörmelék eltávolítása céljából centrifugáljuk (27000 g, 4°C, 30 perc).

9. A szolubilizált ROS-membrán 20 ml-ét *Sepharose 2B* oszlophoz adjuk, amelyre előzetesen PMc 6E7-et (ellenanyagot) kötöttünk. A mosást 10 térfogatnyi CHAPS-oszloppufferrel végezzük [10 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 1 mM kalcium-klorid, 0,15 M kálium-klorid, 12 mM CHAPS, 2 mg/ml azolektin].

10. A célfehérjét 0,1 mg/ml 6E7-peptidet tartalmazó CHAPS-oszloppufferrel oldjuk le.

(5-3) Eljárás fehérjének fehérjéhez vagy peptid-fragmenshez történő kötődésének alkalmazásával

#### A. Strep-címke és sztreptavidin

Ismert már eljárás Strep-címkét - amely egy sztreptavidinnel szemben affinitást mutató oligopeptid - tartalmazó fehérje affinitáson alapuló tisztítására. Lásd például, Skerra, A. és Schmidt, T. G., "Use of the Strep-Tag and Streptavidin for Detection and Purification of Recombinant Proteins", *Methods in Enzymology* 326, 271-311



(2000); BioTechniques 28, 338-344 (2000). Ez a kombináció is alkalmazható a találmány szerint.

Ebben a Strep-címkének sztreptavidinhez történő kötődését alkalmazó eljárásban a Strep-címke például a következő aminosavszekvenciájú oligopeptid lehet: Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly vagy Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Strep-Tag II). Strep-címkét tartalmazó fehérje, például DHFR (dihidrofolát-reduktáz), sejtmentes rendszerben szintetizálható. Ezt azután rögzített sztreptavidinhez vagy Strep Tactinhoz történő adszorpcióval tisztítjuk. Eluensként deztibiotint alkalmazunk.

A következő módszer Strep-címkével jelölt fehérjekomponensnek Strep-címke és sztreptavidin alkalmazásával történő előállítására mutat be egy példát. Ennek az eljárásnak számos változata ismert, ezek közül kiválasztható a megfelelő.

1. Transzformált *E. coli* sejtek egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét 2 l, friss (ampicillint 100 µg/ml végkoncentrációban tartalmazó) LB-tápközeghez adjuk, és  $OD_{550}=0,5$  értékig inkubáljuk 22°C-on történő rázatás (200 rpm) közben.

2. A génexpresszió indukálása érdekében 200 µl 2 mg/ml anhidrotetraciklin-dimetilformamid (DMF) oldatot adunk a sejtekhez. Ezt követően további 3 órán keresztül folytatjuk az inkubációt.



3. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük (4200 g, 4°C, 12 perc). Az üledéket 20 ml P-pufferben szuszpendáljuk [100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM szacharóz, 1 mM dinátrium-EDTA], és jégen 30 percen keresztül inkubáljuk.

4. A szferoplasztokat centrifugálással távolítjuk el (27000 g, 4°C, 15 min).

5. Az így kapott periplazma-frakciót 2 l pufferrel szemben dializáljuk [100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM dinátrium-EDTA] egy éjszakán keresztül.

6. *StrepTactin Sepharose* oszlopot W-pufferrel egyensúlyba hozunk. A fehérjeoldatot egy perisztaltikus pumpából, egy UV-detektorból ( $A_{280}$ ) és egy frakciószedőből álló rendszerrel az oszlopra töltjük.

7. Az oszlopot W-pufferrel mossuk, amíg az  $A_{280}$  érték el nem éri az alapvonalat.

8. A célfehérjét 2,5 mM deztibiotint tartalmazó W-pufferrel mossuk le.

#### B. S-peptid és S-fehérje

Ismert, hogy ribonukleáz S fehérjefragmense (S-fehérje) erősen és reverzibilisen kötődik az S-peptid-fragmenséhez (S-peptid). Fehérjék ezen kötődés felhasználásával tisztíthatók. Konkrétan, egy S-címkével jelölt fehérje (azaz amelyhez egy S-peptid kapcsolódik) olyan agarózzal fogható meg, amelyben S-fehérjét rögzítettünk. Az elúció az S-címke és az S-fehérje közötti kötés hasításával végezhető, például 3 M guanidinium-tiocianáttal, 0,2 M kálium-citrát pufferben, pH 2, 3 M magnézium-kloriddal. [Raines, R. T., McCormick, M., Oosbree, T. R. V., Mierendorf, R. C.,

"The S-Tag Fusion System for Protein Purification", *Methods in Enzymology* 326, 362-376 (2000)].

A következő módszer vázlatosan egy példát mutat be erre az eljárásra, amely adott esetben módosítható.

1. Az S-fehérje-agaróz keverékből (Novagen) 2 ml-t adunk a célfehérjét expresszáló sejtek kivonatához [gazda-sejtek: baktériumok, rovarsejtek, emlőseredetű sejtek lehetnek, vektor: pET, pBAC (Novagen)] és szobahőmérsékleten, 30 percen keresztül alaposan elkeverjük.

2. Centrifugáljuk (500 g, 10 perc) és a felülúszót elöntjük.

3. Az S-fehérje-agaróz keveréket, amelyhez a célfehérje hozzákötődött, kötő/mosó pufferben szuszpendáljuk [20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,15 M nátrium-klorid, 0,1% (tf/tf) Triton X-100].

4. Centrifugálás után (500 g, 10 min), a felülúszót leöntjük, így eltávolítjuk a nem specifikusan kötődött fehérjéket.

5. Az S-fehérje-agaróz keveréket 1,5 térfogat elúciós pufferben szuszpendáljuk [kötő/mosó puffer + 3 M guanidinium-tiocianát, 0,2 M kálium-citrát (pH 2), vagy 3 M magnézium-klorid].

6. Szobahőmérsékleten inkubáljuk 10 percen keresztül, időnként kevertetve, hogy szuszpendált állapotban maradjon.

7. Centrifugálást követően az így lemosott célfehérjét összegyűjtjük.



C. Kalmodulinkötő fehérje (CBP, "calmodulin-binding protein") és kalmodulin (CaM)

Ezen eljárás szerint a fehérjét a kalmodulinkötő fehérje (CBP) és a kalmodulin közötti kölcsönhatás kihasználásával tisztítjuk [Vaillantcourt, P., Zheng, Chao-Feng, Hoang, D. Q. és Breister, L., "Affinity Purification of Recombinant Proteins Fused to Calmodulin or to Calmodulin-Binding Peptides", *Methods in Enzymology* 326, 340-362 (2000)]. Ez a kombináció szintén alkalmazható a találmány szerint.

A CBP-vel fuzionált fehérje egy fehérjekomponensből és ehhez kapcsolódó CBP-ből áll. Ezt azután *Sepharose 4B* alapú CaM affinitási gyantán vagy más, kereskedelmi forgalomban kapható CaM-gyantán történő adszorpcióval tisztítjuk. Az elúcióhoz  $\text{Ca}^{2+}$  ionnal kelátot képező EGTA-t alkalmazunk.

A következő módszer egy példát mutat be CBP-vel fuzionált fehérje készítésére CBP és CaM alkalmazásával. Ennek az eljárásnak számos változata ismert, és kiválasztható közülük a megfelelő.

1. A transzformált sejtek (a vektor a pCA-sorozat, amelyet a pET-11-ből készítettünk) egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét 1 l, 50  $\mu\text{g/ml}$  ampicillint vagy karbenicillint tartalmazó LB-tápközeghez adjuk. A sejteket  $\text{OD}_{600}=0,6\sim 10$  érték eléréséig inkubáljuk. Ezután 1 mM végkoncentrációban IPTG-t adunk a tenyészethez, és további 3-5 órán keresztül folytatjuk az inkubációt rázatás közben.



2. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük. A sejt-üledéket 0,2 mg/ml lizozimot tartalmazó A-pufferben szuszpendáljuk [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM nátrium-klorid, 10 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM magnézium-acetát, 1 mM imidazol, 2 mM kalcium-klorid). A sejteket szonikálással szétzúzzuk.

3. A sejtek lizátumát centrifugáljuk (25000 g, 15 perc), és a felülúszót összegyűjtjük.

4. A *CaM Sepharose* gyanta 10 ml-ét A-pufferrel egyensúlyba hozzuk.

5. A *CaM Sepharose* gyantát összekeverjük a sejt-lizátummal és 1 órán keresztül gyengén kevertetjük. Alacsony sebességgel centrifugáljuk, és az üledéket és ezzel a nem specifikusan kötődött anyagokat eltávolítjuk.

6. A mosást 40 ml A-pufferrel végezzük, ezután 20-30 ml A-pufferben szuszpendáljuk, és oszlopra töltjük. Egymás után 5 oszloptérfogatnyi A-pufferrel és B-pufferrel mossuk [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM nátrium-klorid, 10 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM magnézium-acetát, 1 mM imidazol, 0,1 mM kalcium-klorid), míg az UV-detektor  $A_{280}$  értéke el nem éri az alapvonalat.

7. A célfehérjét 2 mM EGTA-t tartalmazó B-pufferrel mossuk le.

#### D. HSA és ABP

Beszámoltak olyan, fehérje tisztítására szolgáló eljárásról, amely során humán szérum albuminnak (HSA) szérum albumint kötő affinitású anyaghoz (ABP) [Graslund, T., Nilsson, J., Lindberg, A. M., Uhlen, M. és Nygren, Per-Ake,

"Production of a Thermostable DNA Polymerase by Site-Specific Cleavage of A Heat-Eluted Affinity Fusion Protein", Protein Expression and Purification 9, 125-132 (1997)]. Az eljárás során a célfehérjét szérumban albumin kötő affinitású anyaggal („nyéllel”; ABP) alkotott fúziós fehérjeként expresszáljuk, majd HSA-Sepharose oszlopon fogjuk meg, és alacsony pH-értékű pufferrel mossuk le. Ez a kombináció is alkalmazható a találmány szerint.

A következő módszer vázlatosan mutatja be ezt a fehérjetisztítási eljárást.

1. A transzformált sejtek [gazda: *E. coli*, vektor: pET-21a (Novagen)] egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét 500 ml TSB + YE tápközeghez adjuk (30 g/l tripszines szója-tápanyag, 5 g/l élesztőkivonat, 100 mg/l ampicillin, 34 mg/l kloramfenikol), majd rázatás közben inkubáljuk, amíg az  $OD_{600}=0,8-1,5$  értéket el nem éri.

2. A fuzionált fehérje expressziójának indukálása érdekében 1 mM végkoncentrációban izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktózidot adunk hozzá, és további 3-5 órán keresztül folytatjuk az inkubálást.

3. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük. A sejttöledéket TST-ben szuszpendáljuk [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 M nátrium-klorid, 0,05% Tween 20, 1 mM EDTA], és a sejteket szonikálással szétzúzzuk.

4. A szétzúzott sejtek szuszpenzióját centrifugáljuk (20000 g, 30 perc). Az így kapott felülúszót 1,2  $\mu$ m-es hidrofíli szűrőn szűrjük át.

5. A sejtkivonatot HSA-Sepharose oszlopra töltjük.

6. A célfehérjét 0,5 M Hac-oldattal mossuk le (pH 2,8).

(5-4) Eljárás fehérjének specifikus, kis molekulású-lyú vegyülethez, például aminosavhoz, DNS-hez, festékhez, vitaminhoz vagy lektinhez történő kötődésének alkalmazásával

#### A. Glutation-S-transzferáz (GST) és glutation

Egy általánosan használt eljárás fehérje tisztítására a GST és a glutation közötti kölcsönhatást használja fel, amelyet GST-„lehúzási” eljárásnak neveznek. Lásd például, Tanpakushitsu Jikken Noto (Protein Experiment Note) (I), 5:1. fejezet, 162 "GST-Yugo Tanpakusthito no Hatugen to Seisei" ("Expression and Purification of GST-Fused Protein"), Suetake, Smith, D. B., "Generating Fusions to Glutathione S-Transferase for Protein Studies", Methods in Enzymology 326, 254-270 (2000). Ez a kombináció is alkalmazható a találmány szerint.

Az eljárás során a célfehérjének GST-vel alkotott fúziós fehérjéjét készítjük el, majd adszorbensként glutationt tartalmazó agaron adszorbeáltatjuk. Az elúcióhoz redukált glutationt alkalmazunk. A GST-fúziós fehérje géntechnológiai úton történő elkészítése jól ismert, például *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* vagy *Schizosaccharomyces pombe* lehetnek gazdaszervezetek.

A következő módszer vázlatosan egy példát mutat be GST-vel fuzionált fehérje előállítására GST és glutation alkalmazásával. Ennek az eljárásnak számos változata ismeretes, és kiválasztható közülük a megfelelő.

1. A transzformált sejtek egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét 1 l, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó L-tápközeghez adjuk, és tovább inkubáljuk.

2. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük (5000 g), majd az üledéket 20 ml jéghideg, redukáló anyagot, például 1-5 ml ditiotreitolt (DTT) vagy 0,1% 2-merkaptóetanolt tartalmazó PBS-ben szuszpendáljuk.

3. A szuszpendált sejteket jégen gyengén szonikáljuk, amíg a szuszpenzió meg nem szűnik. Ez az állapot úgy ellenőrizhető, hogy az oldat tompa szürke színűvé válik körülbelül 5 percen belül.

4. Az oldathoz Triton X-100-at adunk 1% végkoncentrációban és centrifugáljuk (10000 g, 4°C, 5 perc). A felülúszót 50 ml-es csőbe öntjük. Előre megduzzasztott 50%-os glutation-agaróz gyöngyök 1 ml-ét adjuk hozzá, és adott esetben megkeverve 4°C-on, 30 percen keresztül inkubáljuk.

5. A gyöngyöket centrifugálással összegyűjtjük (500 g, 30 perc), és háromszor mossuk 50-50 ml jéghideg PBS-sel.

6. A gyöngyökről a fúziós fehérjét a azonos térfogatú, frissen készített, 50 mM Tris-HCl (pH 8) pufferrel szobahőmérsékleten, 5 percen keresztül történő gyenge kevertetéssel mossuk le.

7. A felülúszót centrifugálás után eltávolítjuk (500 g, 30 sec), és 10% végkoncentrációban glicerint adunk hozzá, majd kis térfogatra osztjuk és -80°C-on tároljuk.

#### B. Fehérje és festékligand

Beszámoltak róla, hogy *Zymononas mobilis*ből származó, natív fehérje affinitást mutat bizonyos festékek felé, pél-

dául C. I. 17908, Reactive Red 8 és C. I. Reactive Blue 187, és a fehérje ezen jellemzője alapján tisztítható [Scopes, R. K. és Griffiths-Smith, K., "Use of Differential and Dye-Ligand Chromatography with Affinity Elution for Enzyme Purification: 6-Phosphogluconate Dehydratase from *Zymononas mobilis*", Analytical Biochemistry 136, 530-534 (1984)]. Konkrétan, a célfehérje ennek a fehérjének egy részével vagy teljes egészével történő jelöléssel, majd Sepharose affinitásoszlopon az előzőekben ismertetett festékek, mint ligandnak alkalmazásával történő adszorpcióval, majd lemosással tisztítható. A következő módszer *Zymononas mobilis* eredetű fehérje tisztítására mutat be egy eljárást.

1. *Zymononas mobilis* folyékony tenyészetéből kiindulva extrakciós pufferrel [20 mM K-Mes (pH 6,5), 30 mM nátrium-klorid, 5 mM mangán-klorid, 0,5 mM ammónium-vas-szulfát, 10 mM  $\beta$ -merkaptoetanol] sejtkivonatot készítünk.

2. A sejtkivonatot egymás után *Scarlet MX-G* (C. I. 17908, Reactive Red 8)-*Sepharose CL-48* oszlopra (Pharmacia) és *Blue HE-G* (C. I. Reactive Blue 187)-*Sepharose CL-4B* oszlopra töltjük.

3. Az oszlopokat 100 ml extrakciós pufferrel mossuk.

4. A *Scarlet MX-G* oszlopot nem, csak kizárólag a *Blue-HE-G* oszlopot mossuk 20 mM nátrium-szulfátot tartalmazó extrakciós pufferrel.

5. A *Zymononas mobilis*ből származó célfehérjét 20 mM DL- $\alpha$ -glicerofoszfáttal eluáljuk.

C. Eljárás biotinnak avidinhez történő kötődésének alkalmazásával

Biotinnak avidinhez történő specifikus kötődésén alapuló fehérjetisztítási eljárás már régóta ismert [lásd például, Alche, J. D. és Dickinson, H., "Affinity Chromatographic Purification of Antibodies to a Biotinylated Fusion Protein Expression in *Escherichia coli*", Protein Expression and Purification 12, 138-143 (1998)]. Az eljárás során kialakítunk egy biotinból és a célfehérjéből álló, fúziós fehérjét egy 122 aminosavból álló szekvencia alkalmazásával, amely a gazdában (például *E. coli*) biotinálódik, majd ezt a fúziós fehérjét fogjuk meg olyan oszlopon, amelyre avidint kötöttünk [például, *SoftLink soft release avidin resin* (lassan felszabaduló avidinyanta) (Promega)], majd biotinnal kompetitíven eluáljuk. Ez a kombináció is alkalmazható a találmány szerint.

1. A génexpresszió indukálása érdekében 1 mM IPTG-t (végkoncentráció) adunk a transzformált sejtek egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetéhez [gazda: *E. coli*, vektor: PinPoint Xa-2 (Promega)], és további 5 órán keresztül inkubáljuk. Abban az esetben, ha az így expresszált fehérje a sejten belül marad, a következőképpen járunk el.

2. Lizáljuk a sejteket a sejtüledék minden grammjához 10 ml puffer hozzáadásával [50 mM Tris-HCl (pH8,0), 1 mM EDTA, 50 mM nátrium-klorid, 0,1 mM PMSF, 1 mg/ml lizozim].



3. A célfehérjét tartalmazó csapadékot centrifugálás-sal összegyűjtjük (18000 g, 15 perc), és pufferben szuszpendáljuk [50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 50 mM nátrium-klorid, 0,5% Triton X-100, 0,1 mM PMSF], majd kétszer mossuk.

4. Centrifugálást követően (18000 g, 15 perc) az így kapott üledéket szolubilizációs pufferben szuszpendáljuk [50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 50 mM nátrium-klorid, 0,5% Triton X-100, 0,1 mM PMSF, 6 M guanidin-HCl).

5. A sejtkivonatot 3 ml, a szolubilizációs puffer 30 ml-ével előzőleg egyensúlyba hozott *SoftLink soft release avidin resin*, lassan felszabaduló avidinyanta-oszlophoz (Promega) adjuk. Ezt követően 60 ml szolubilizációs pufferrel mossuk.

6. A biotinált célfehérjét 5 mM biotint tartalmazó szolubilizációs oldattal mossuk le.

#### (5-5) Eljárás fehérjének szacharózhoz történő kötődésének alkalmazásával

Ebben az eljárásban a fehérjét a szacharózkötő fehérjének szacharózzal történő kölcsönhatása alapján tisztítjuk. Ismeretes például maltózkötő fehérjének (MBP, "maltose-binding protein") amilózzal együtt történő alkalmazása [Sachdev, D. és Chirgwin, J. M., "Fusions to Maltose-Binding Protein: Control of Folding and Solubility in Protein Purification", *Methods in Enzymology* 326, 312-321 (2000)]. Várhatóan  $\beta$ -galaktóz-kötő fehérjék, például galektin és  $\beta$ -galaktóz közötti kölcsönhatás is alkalmazha-

tó. Ezek a kombinációk szintén használhatók a találmány szerint.

#### A. Maltózkötő fehérje és amilóz

Ebben az eljárásban, ahol a maltózkötő fehérje egy fúziós fehérjéjét olyan gyantára adszorbeáltatjuk, amelyre amilózt rögzítettünk, maltózt használunk eluensként. A következő módszer maltózkötő fehérje fúziós fehérjéjének termelési eljárására mutat be egy példát. Ennek az eljárásnak számos változata ismert, és közülük kiválasztható a legmegfelelőbb.

1. Transzformált sejtek [*E. coli*/vektor pMAL-c2 (New England Biolabs) egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetének 2 ml-ét 225 ml, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LBD-tápközeghez (0,2% glükózt tartalmazó LB-tápközeg) adjuk, és rázatás közben inkubáljuk OD<sub>600</sub>=0,5 értékig, 37°C-on.

2. A génexpresszió indukálása érdekében 0,3 mM izopropil-β-tiogalaktopiranozidot (IPTG) adunk a sejtekhez, és az inkubációt további 2-3 órán keresztül folytatjuk 30°C-on.

3. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük (6800 g, 5 perc). A sejtüledéket 10 ml oszloppufferben szuszpendáljuk [20 mM Tris (pH 7,4), 200 mM nátrium-klorid, 1 mM EDTA, 0,02% Tween 80], és -20°C-on lefagyasztjuk egy éjszakán keresztül.

4. A fagyasztott sejtszuszpenziót jég-víz elegyben felolvasztjuk és 10 ml oszloppufferben hígítjuk. A sejteket szonikálással szétzúzzuk (intenzitás: a maximális szint 75%-a).

5. Centrifugálást követően (20000 g, 4°C, 15 perc) a felülúszót 10 ml oszloppufferben hígítjuk (nyers kivonat).

6. A nyers kivonatot 10 ml amilóz-gyantaoszlopra töltjük.

7. Az oszlopot többször mossuk 20-30 ml térfogatú oszloppufferrel. A célfehérjét 10 mM maltózt tartalmazó oszloppufferrel mossuk le.

B. Kitin és kitinkötő domén (CBD, "chitin-binding domain")

Ezen eljárás során kitinnek kitinkötő doménhez (CBD) történő kötődést használjuk fel a fehérje tisztítására. Konkrétan, inteinen (biotechnológiailag átalakított fehérjehasító elemek indukálható, önmagát hasító aktivitása) keresztül a célfehérjéhez kötött kitinkötő fehérjéből álló fúziós fehérjét expresszálunk, majd kitin-affinitásoszlopra adszorbeáltatjuk (New England Biolabs). A lemosás során az intein és a célfehérje közötti kötést egy redukáló anyaggal, például DTT-vel,  $\beta$ -merkaptóetanollal vagy ciszteinnel hasítjuk [lásd például, Park, Chung-Mo, Shim, Jae-Yoon, Yang, Song-Sook, Jeong-Gukang, Jeong-Il Kim, Luka, Z. és Song, Pill-Soon, "Chromophore - Apoprotein Interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 Phytochrome Cph1.", *Biochemistry* 39, 6349-6356 (2000)]. Ennek az eljárásnak a találmány szerinti fehérjekomponenseknél történő alkalmazásakor a fehér-

jekomponenseket a CBD-inteinen kívül egy kapcsoló anyaggal is jelöljük, és ezt a kapcsoló jelölést használjuk a fehérjekomponenseknek az *in vitro* szintézisrendszerben képződött célfehérjétől történő elválasztására.

A következő módszer nagy vonalakban egy példát mutat be a fehérjetisztítás ezen eljárására. Számos változata ismert, és ezek közül kiválasztható a megfelelő.

1. Transzformált sejtek [gazda: *E. coli*, vektor: pTYB2 (New England Biolabs)] egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetét 250 ml RB-tápközeghez adjuk [0,5% élesztőkivonat, 1% tripton, 0,5% nátrium-klorid, 0,2% glükóz (pH 7,5)] és 30°C-on, OD<sub>600</sub>=0,6 értékig inkubáljuk.

2. A fúziós fehérje expresszióját 1 mM végkoncentrációban IPTG hozzáadásával inkubáljuk, és az inkubációt további 14-16 órán keresztül keresztül folytatjuk 20°C-on.

3. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük (5000 g, 5 perc). A sejtüledéket jéghideg lízis pufferben szuszpendáljuk [Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM nátrium-klorid, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA], majd a sejteket szonikálással szétzúzzuk.

4. A felülúszót centrifugálással összegyűjtjük (100000 g, 30 perc), és 0,2 mm-es filtermembránon szűrjük keresztül.

5. A sejt kivonat 1,5 ml-éhez 20 µl, 2 mM DMSO-t adunk. Jégen, 1 órán keresztül inkubáljuk, majd kitin-affinitásoszlopra töltjük.



6. Az oszlopot pufferrel mossuk [20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM nátrium-klorid, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100]. Egy éjszakán keresztül, 4°C-on inkubáljuk 1 mM DTT-t (végkoncentráció) tartalmazó pufferben, hogy az intein önmagát hasító aktivitását indukáljuk. A felszabaduló célfehérje ezután összegyűjthető.

(5-6) Eljárás fehérjének vagy peptidfragensnek ioncserélő gyantához történő kötődésének alkalmazásával

A. PoliArg és ioncserélő gyanta

Ebben az eljárásban a fehérjét annak a jelenségnek a felhasználásával tisztítjuk, hogy PoliArg-gal jelölt célfehérje, mivel pozitív töltésű, kötődik a kationcserélő gyantához (például, SP-TSK HPLC-oszlophoz). Az elúciót az ionerősség változtatásával hajtjuk végre [Smith, J. C., Derbyshire, R. B., Cook, E., Dunthorne, L., Viney, J., Brewer, S. J., Sassenfeld, H. M. és Bell, L. D., "Chemical Synthesis and Cloning of a Poly (Arginine) - Coding Gene Fragment Designed to Aid Polypeptide Purification", *Gene* 32, 321-327 (1984)].

A következő módszer vázlatosan egy példát ismertet az előzőekben említett eljárásra. Számos változata ismert, és ezek közül kiválasztható a megfelelő.

1. A transzformált sejtek (gazda: *E. coli*, vektor: pWT221) egy éjszakán keresztül szaporított tenyészetének 6 ml-ét 300 ml, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó M9-tápközeghez adjuk, és  $A_{600}=0,4$  értékig inkubáljuk 37°C-on történő rázatással.

2. Ezt követően IAA-oldatot (20 mg/ml etanolban) adunk hozzá 20 µg/ml végkoncentrációban.

3. 1% (végkoncentráció) Polymin P-t adunk hozzá, és a sejteket centrifugáljuk.

4. A sejtüledéket pufferben lizáljuk [40 mM Tris-acetát (pH 5,5), 5 M karbamid], és ugyanezzel a pufferrel szemben dializáljuk.

5. A sejtkivonat 0,1 ml-ét SP-TSK HPLC-oszlopra töltjük, és az oszlopot ugyanezzel a pufferrel mossuk.

6. A célfehérjét pufferben mossuk le [40 mM PIPES (pH 6,0), 5 M karbamid] nátrium-klorid koncentrációgradienssel (100-350 mM).

#### (5-7) Eljárás gyöngyök alkalmazásával

Kereskedelmi forgalomban kaphatók egyforma részecske-méretű, mágneses gyöngyök (*Dynabeads<sup>TM</sup>*, DYNAL, Norway), amelyek egy polimer magból állnak, amelyben egyenletesen elosztva mágnesezhető anyag található, és amelyet hidrofil polimervesz körül. A felületéhez különböző ellenanyagok rögzíthetők, így a gyöngyök sejtekhez és fehérjékhez is köthetők. Erős mágnes közelében (MPC), a mágneses gyöngyök megmágnesezhetők, és mágnesesen vonzhatók. Ha a mágnest eltávolítjuk a gyöngyök demagnetizálódnak és újra szétszóródnak. Ezen jellemzőjük alapján a mágneses gyöngyök például sejtek és fehérjék tisztítására alkalmazhatók. Beszámoltak például arról, hogy perifériás vér B-limfocitákat izoláltak CD19-ellenanyaggal borított, mágneses poliszitirén gyöngyök (DYNAL) alkalmazásával [Kanegasaki, S. és mtsai., J. Biochem., 117, 758-765 (1995)]. A találmány szerinti reak-



ciórendszert alkotó fehérjekomponensek mágneses gyöngyökkel is jelölhetők, és ily módon mágneses úton távolíthatók el a reakciórendszerből. Tehát a mágneses gyöngyöknek mágnessel történő alkalmazása is az egymással kölcsönhatásba lépő anyagok találmány szerinti kategóriájába tartozik.

A találmányt részletesebben a következő példák segítségével mutatjuk be. Nyilvánvaló azonban, hogy a találmány nem korlátozódik ezekre a példákra.

### 1. példa

#### *E. coli* riboszómakészítmények és S100 extrakciója

*E. coli* A19 sejtek 300 g-ját (amelyeket a középső log-fázisban gyűjtöttünk be) alumínium-oxiddal eldörzsöltük. A feltárt sejteket A-pufferben szuszpendáltuk [10 mM Heps-KOH (pH 7,6), 10 mM magnézium-klorid, 50 mM kálium-klorid, 1 mM DTT)], majd az alumínium-oxidot és a sejttörmeléket centrifugálással eltávolítottuk (30000 g, 1 óra, 4°C). A képződő felülúszó-frakcióhoz 1 µg/ml végkoncentrációban DN-ázt (dezoxiribonukleázt) adtunk, majd centrifugáltuk (100000 g, 4 óra, 4°C). Az így nyert felülúszó-frakciót nevezzük S100-nak. Az üledéket az A-pufferben szuszpendáltuk, és a képződő szuszpenziót nevezzük nyers riboszómakivonatnak. Ebből a nyers riboszómakivonatból nyertük a szorosan kapcsolt („tight coupled”) riboszómafrakciót 6-36% szacharóz-sűrűséggradienssel. Ezt a szorosan kapcsolt riboszómafrakciót 100000 g-vel centrifugáltuk, és az üledéket riboszómapufferben szuszpendáltuk [20 mM Heps-KOH (pH 7,6), 6 mM MgOAc, 30 mM ammónium-klorid, 7 mM β-

merkaptoetanol], amellyel elkészítettük a szorosán kapcsolt riboszómát. Az 1. ábrán mutatjuk be a szacharóz-sűrűséggradiensén kapott riboszómafrakciókat.

## 2. példa

Plazmidok készítése iniciációs faktorok, elongációs faktorok és terminációs faktorok fokozott mértékű expresszáására

*E. coli* A19 genomjának templátként történő alkalmazásával az EF-Tu-gént kódoló génszekvenciát PCR-rel amplifikáltuk, amellyel egy olyan DNS-fragmenst kaptunk, amelynek az 5'-végén *EcoRI* felismerő szekvencia és a 3'-végén *BglIII* felismerő szekvencia található. Az így kapott DNS-fragmenst *EcoRI*-gyel és *BglIII*-vel hasított pQE60-plazmidba építettük (Qiagen). Ily módon elkészült a C-terminális végen His-címkével fuzionált EF-Tu-t fokozott mértékben expresszálni képes vektor. Ezt követően *E. coli* BL21/pREP4 törzset transzformáltunk az előzőek szerinti vektorral. Elongációs faktorok, iniciációs faktorok és terminációs faktorok fokozott mértékű expresszáására szolgáló vektorok hasonló módon készíthetők. Az 1. táblázatban foglaljuk össze az alkalmazott vektorokat és restrikciós enzimeket és a His-címke helyét.

### 3. példa

Aminoacil-tRNS-szintetáz (ARS) és metionin-tRNS-formiláz (MTF) fokozott mértékű expresszáására szolgáló plazmidok készítése

*E. coli* A19 genomjának templátként történő alkalmazásával az alanil-tRNS-szintetáz-gént kódoló génszekvenciát PCR-rel amplifikáltuk, amellyel egy olyan DNS-fragmenst kaptunk, amelynek az 5'-végén *Sph*I felismerő szekvencia és a 3'-végén *Hind*III felismerő szekvencia található. Az így kapott DNS-fragmenst *Sph*I-gyel és *Hind*III-mal hasított pQE30-plazmidba építettük (Qiagen). Ily módon elkészült az N-terminális végen His-címkével fuzionált alanil-tRNS-szintetázt fokozott mértékben expresszálni képes vektor. Ezt követően *E. coli* BL21/pREP4 törzset transzformáltunk az előzőek szerinti vektorral. Más ARS- és MTF-szekvenciák fokozott mértékű expresszáására szolgáló vektorok hasonló módon készíthetők. Az 1. táblázatban foglaljuk össze az alkalmazott vektorokat és restriktív enzimeket és a His-címke helyét, a kapott plazmidokat *E. coli* BL21/pREP4 (pQE-sorozatok) törzsébe vagy BL21/DE3 (pET-sorozatok) törzsébe transzformáltuk.



1. táblázat

Enzimek és faktorok	vektor	N-terminális R. E.	C-terminális R. E.	His-címke helye
AlaRS	pQE30	<i>SphI</i>	<i>HindIII</i>	N
ArgRS	pET16b	<i>NdeI</i>	<i>BamHI</i>	N
AsnRS	pQE30	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	N
AspRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
CysRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
GlnRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
GluRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
GlyRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
HisRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
IleRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>HindIII</i>	N
LeuRS	pET21a	<i>XbaI</i>	<i>XhoI</i>	C
LysRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
MetRS	pET21a	<i>XbaI</i>	<i>XhoI</i>	C
PheRS	pQE30	<i>SphI</i>	<i>HindIII</i>	N
ProRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
SerRS	pET21a	<i>XbaI</i>	<i>XhoI</i>	C
ThrRS	pQE30	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	N
TrpRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
TyrRS	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
ValRS	pET21a	<i>XbaI</i>	<i>NotI</i>	C
MTF	pET21a	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	C
IF1	pQE30	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	N
IF2	pQE30	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	N
IF3	pQE30	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	N
EF-G	pQE60	<i>MunI</i>	<i>BglII</i>	C
EF-Tu	pQE60	<i>EcoRI</i>	<i>BglII</i>	C
EF-Ts	pQE60	<i>NcoI</i>	<i>BamHI</i>	C
RF1	pQE60	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	C

R. E.: restrikciós enzim

#### 4. példa

##### T7RNS-polimerázt fokozott mértékben expresszázó plazmid készítése

T7-Fág genomjának templátként történő alkalmazásával a T7RNS-polimeráz-gént kódoló génszekvenciát PCR-rel amplifikáltuk, amellyel egy olyan DNS-fragmenst kaptunk, amelynek az 5'-végén *Bam*HI felismerő szekvencia és a 3'-végén *Pst*I felismerő szekvencia található. Az így kapott DNS-fragmenst *Bam*HI-gyel és *Pst*I-gyel hasított pQE30-plazmidba építettük (Qiagen). Ily módon elkészült az N-terminálison His-címkével fuzionált T7RNS-polimerázt fokozott mértékben expresszálni képes vektor. Ezt követően *E. coli* BL21/pREP4 törzsét transzformáltuk az előzőek szerinti vektorral.

#### 5. példa

##### Nukleozid-difoszfát-kinázt (NDK) és más enzimeket fokozott mértékben expresszázó plazmidok készítése

*E. coli* A19 genomjának templátként történő alkalmazásával az NDK-gént kódoló génszekvenciát PCR-rel amplifikáltuk, amellyel egy olyan DNS-fragmenst kaptunk, amelynek az 5'-végén *Bam*HI felismerő szekvencia és a 3'-végén *Hind*III felismerő szekvencia található. Az így kapott DNS-fragmenst *Bam*HI-gyel és *Hind*III-mal hasított pQE30-plazmidba építettük (Qiagen). Ily módon elkészült az N-terminálison His-címkével fuzionált NDK-t fokozott mértékben expresszálni képes vektor. Ezt követően *E. coli* BL21/pREP4 törzsét transzformáltuk az előzőek szerinti vektorral. Más, a (4-1) és (4-2) pontokban példaként bemuta-

tott enzimek fokozott mértékű expresszáására szolgáló plazmidok, kívánt esetben, hasonló módon készíthetők.

### 6. példa

#### Iniciációs faktorok, elongációs faktorok és terminációs faktorok fokozott mértékű expressziója és tisztítása

A His-címkével jelölt EF-Tu (EF-Tu<sup>\*</sup>) fokozott mértékű expressziója érdekében a 2. példa szerinti BL21/pREP4 transzformáns sejteket 6 l LB-tápközegben szaporítottuk, amíg az optikai sűrűség (OD<sub>660</sub>) eléri a 0,7 értéket. Ekkor a tenyészethez IPTG-t (izopropil-1-tio-β-D-galaktozidot) adtunk 0,1 M végkoncentrációban, és az inkubációt további 4 órán keresztül folytattuk 37°C-on. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, szuszpenziós pufferben szuszpendáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 0,3 mg/ml lizozim, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM PMSF (fenil-metán-szulfonil-fluorid), 6 mM β-merkaptoetanol], majd szonikálással szétzúztuk. A sejtörmeléket centrifugálással eltávolítottuk 100000g, 1 óra, 4°C-on. Az így kapott felülúszót töltöttük Ni<sup>2+</sup> előre töltött 10 ml-es *Hi-Trap* kelátkötő oszlopra (Pharmacia) és 100 ml, 10 mM imidazol tartalmazó HT-pufferrel mostuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid]. Az oszlopról az EF-Tu<sup>\*</sup>-t HT-pufferben lineáris imidazol gradienssel (10 mM-tól 400 mM-ig) mostuk le. Az ily módon tisztított EF-Tu<sup>\*</sup>-frakciókat összegyűjtöttük, és törzspufferrel szemben dializáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM kálium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 30%

glicerin]. A tisztított EF-Tu<sup>\*</sup> koncentrációját standard görbe alapján határoztuk meg, amelyet *Bio-Rad* fehérjevizsgáló reagenskészlettel készítettünk BSA (marhaszérum albumin) standardként történő alkalmazásával. Az így nyert EF-Tu<sup>\*</sup>-t 1 ml-es egységekben folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk. Egyéb, His-címkével jelölt elongációs faktorok, iniciációs faktorok és terminációs faktorok hasonló módon tisztíthatók. A 2. ábrán His-címkével jelölt faktorok 12%-os SDS-PAGE-mintázatát mutatjuk be (Coomassie Brilliant Blue festéssel).

A His-címkével jelölt iniciációs faktorok (IF1, IF2 és IF3; "\*" jelentése "His-címkével jelölt") aktivitását és optimális koncentrációit DHFR mRNS-sel mértük *in vitro* translációs rendszerben (lásd 17. példa a következőkben). Pozitív kontrollként mind IF1<sup>\*</sup>-et, IF2<sup>\*</sup>-t és IF3<sup>\*</sup>-t tartalmazó rendszert alkalmaztunk, az inkubációt 30 percig végeztük a megfelelő iniciációs faktorokat nem tartalmazó rendszerben, majd az így képződött DHFR relatív aktivitásait összehasonlítottuk (3A ábra). Konkrétan, a His-címkével jelölt iniciációs faktorok aktivitásait úgy határoztuk meg, hogy a pozitív kontroll aktivitását 100-nak vettük. Ennek eredményeként kimutattuk, hogy valamennyi, IF<sup>\*</sup>-hiányos rendszerben a DHFR-szint a pozitív kontroll felének vagy annál kevesebbnek felelt meg, amely azt mutatja, hogy mindegyik IF1<sup>\*</sup>, IF2<sup>\*</sup> és IF3<sup>\*</sup> aktív. A His-címkével jelölt iniciációs faktorok optimális koncentrációját *in vitro* rendszerben történő transzlálással határoztuk meg azonos körülmények között, de az iniciációs faktor koncentrációjá-

nak változtatásával, és az így képződő DHFR relatív aktivitásának mérésével (3B ábra). A 3B ábrán az IF1<sup>+</sup>-et ●, az IF2<sup>+</sup>-t ▲ és az IF3<sup>+</sup>-at ■ jelzi.

### 7. példa

His-címkével jelölt ARS-ek és MTF fokozott mértékű expressziója és tisztítása

His-címkével jelölt Ser-tRNS-szintetáz ("\*" jelentése "His-címkével jelölt") fokozott mértékű expressziójára szolgáló BL21/DE3 transzformáns sejteket 2 l LB-tápközegben szaporítottunk, amíg az optikai sűrűség (OD<sub>660</sub>) eléri a 0,7 értéket. Ekkor a tenyészethez IPTG-t (izopropil-1-tio-β-D-galaktozidot) adtunk 0,1 M végkoncentrációban, és az inkubációt további 4 órán keresztül folytattuk 37°C-on. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, szuszpenziós pufferben szuszpendáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 0,3 mg/ml lizozim, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM PMSF (fenil-metán-szulfonil-fluorid), 6 mM β-merkaptoetanol], majd szonikálással szétzúztuk. A sejttörmelékét centrifugálással eltávolítottuk (100000g, 1 óra, 4°C-on). Az így kapott felülúszót töltöttük Ni<sup>2+</sup> előre töltött 10 ml-es *Hi-Trap* kelátképző oszlopra (Pharmacia) és 100 ml, 10 mM imidazolt tartalmazó HT-pufferrel mostuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid]. Az oszlopról a Ser-tRNS-szintetáz<sup>+</sup>-t HT-pufferben lineáris imidazol gradienssel (10 mM-tól 400 mM-ig) mostuk le. Az ily módon tisztított Ser-tRNS-szintetáz<sup>+</sup>-frakciókat összegyűjtöttük, és törzspufferrel szemben dializáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6),



100 mM kálium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 30% glicerin]. A tisztított Ser-tRNS-szintetáz\* koncentrációját standard görbe alapján határoztuk meg, amelyet *Bio-Rad* fehérjevizsgálati reagenskészlettel készítettünk BSA (marhaszérum albumin) standardként történő alkalmazásával. Az így nyert Ser-tRNS-szintetáz\*-t 1 ml-es egységekben folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az 5. ábrán az így kapott Ser-tRNS-szintetáz\* kromatogramját mutatjuk be.

Egyéb ARS\* és MTF fokozott mértékű expressziója és tisztítása hasonló módon végezhető el. A 6. ábrán His-címkével jelölt faktorok és enzimek 12%-os SDS-PAGE-mintázatát mutatjuk be (Coomassie Brilliant Blue festéssel). A 6. ábrán megfigyelhető két GlyRS\* és PheRS\* sáv annak tulajdonítható, hogy ennek a két enzimnek  $\alpha 2$  és  $\beta 2$  típusai vannak. A 6. ábrán látható, hogy ezek a His-címkével jelölt faktorok és enzimek nagy tisztaságban állíthatók elő.

### 8. példa

#### His-címkével jelölt T7RNS-polimeráz fokozott mértékű expressziója és tisztítása

His-címkével jelölt T7RNS-polimeráz ("\*" jelentése "His-címkével jelölt") fokozott mértékű expressziójára szolgáló BL21/pREP4 transzformáns sejteket 6 l LB-tápközegben szaporítottunk, amíg az optikai sűrűség ( $\text{OD}_{660}$ ) eléri a 0,7 értéket. Ekkor a tenyészethez IPTG-t (izopropil-1-tio- $\beta$ -D-galaktozidot) adtunk 0,1 M végkoncentrációban, és az inkubációt további 4 órán keresztül foly-



tattuk 37°C-on. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, szuszpenziós pufferben szuszpendáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 0,3 mg/ml lizozim, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM PMSF (fenil-metán-szulfonil-fluorid), 6 mM  $\beta$ -merkaptoetanol], majd szonikálással szétzúztuk. A sejttörmeléket centrifugálással eltávolítottuk (100000g, 1 óra, 4°C-on). Az így kapott felülúszót töltöttük  $\text{Ni}^{2+}$  előre töltött 10 ml-es *Hi-Trap* keltátképző oszlopra (Pharmacia) és 100 ml, 10 mM imidazolt tartalmazó HT-pufferrel mostuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid]. Az oszlopról a T7RNS-polimeráz<sup>\*</sup>-t HT-pufferben lineáris imidazol gradienssel (10 mM-tól 400 mM-ig) mostuk le. Az ily módon tisztított T7RNS-polimeráz<sup>\*</sup>-frakciókat összegyűjtöttük, és törzspufferrel szemben dializáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM kálium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 30% glicerin]. A tisztított T7RNS-polimeráz<sup>\*</sup> koncentrációját standard görbe alapján határoztuk meg, amelyet *Bio-Rad* fehérjevizsgálati reagenskészlettel készítettünk BSA (marhaszérum albumin) standardként történő alkalmazásával. Az így nyert T7RNS-polimeráz<sup>\*</sup>-t 1 ml-es egységekben folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk. A 12A és B ábrákon az így kapott T7RNS-polimeráz<sup>\*</sup> kromatogramjait mutatjuk be.



### 9. példa

#### His-címkével jelölt NDK és más enzimek fokozott mértékű expressziója és tisztítása

His-címkével jelölt NDK ("\*" jelentése "His-címkével jelölt") fokozott mértékű expressziójára szolgáló BL21/pREP4 transzformáns sejteket 2 l LB-tápközegben szaporítottunk, amíg az optikai sűrűség ( $OD_{660}$ ) eléri a 0,7 értéket. Ekkor a tenyészethez IPTG-t (izopropil-1-tio- $\beta$ -D-galaktozidot) adtunk 0,1 M végkoncentrációban, és az inkubációt további 4 órán keresztül folytattuk 37°C-on. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, szuszpenziós pufferben szuszpendáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 0,3 mg/ml lizozim, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM PMSF (fenil-metán-szulfonil-fluorid), 6 mM  $\beta$ -merkaptoetanol], majd szonikálással szétzúztuk. A sejttörmeléket centrifugálással eltávolítottuk (100000g, 1 óra, 4°C-on). Az így kapott felülúszót töltöttük  $Ni^{2+}$  előre töltött 10 ml-es *Hi-Trap* kelátképző oszlopra (Pharmacia) és 100 ml, 10 mM imidazolt tartalmazó HT-pufferrel mostuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 M ammónium-klorid, 10 mM magnézium-klorid]. Az oszlopról az NDK\*-t HT-pufferben lineáris imidazol gradienssel (10 mM-tól 400 mM-ig) mostuk le. Az ily módon tisztított NDK\*-frakciókat összegyűjtöttük, és törzspufferrel szemben dializáltuk [50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM kálium-klorid, 10 mM magnézium-klorid, 30% glicerin]. A tisztított NDK\* koncentrációját standard görbe alapján határoztuk meg, amelyet *Bio-Rad* fehérjevizsgálati reagenskészlettel készítettünk BSA (marha-

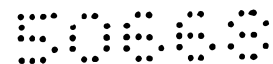


szérum albumin) standardként történő alkalmazásával. Az így nyert NDK<sup>+</sup>-t 1 ml-es egységekben folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk. Más, a (4-1) és (4-2) pontokban például hozott, His-címkével jelölt enzim kívánt esetben hasonló módon állítható elő.

### 10. példa

#### DHFR-gén készítése és mRNS előállítása

Az *E. coliból* származó DHFR-gént (dihidrofolát-reduktáz-gén) az 5'-végéhez egy *Hind*III-szekvenciát, a 3'-végéhez egy *Bam*HI-szekvenciát hozzáadva, PCR-rel amplifikáltuk. A gén T7-promótert tartalmaz egy riboszómakötő helytől 5'-irányban a T7 bakteriofág 10-es génjéből származó "epszilon-szekvenciá"-val együtt, amelyet Shine-Delgarno szekvencia (SD) követ. Ezt a DNS-fragmenst klónoztuk a pUC18-plazmidvektorba (Takara Shuzo). *Sma*I-Enzimmel történő emésztést követően ezt a plazmidot alkalmaztuk templátként "run-off" vagy *in vitro* transzlációval kapcsolt transzkripcióban T7RNS-polimeráz alkalmazásával. Az *in vitro* transzkripció reakciót 42°C-on végeztük, 3 órán keresztül. A reakciókeverék (1 ml) 40 mM Hepes-KOH-t (pH 7,8), 20 mM magnézium-kloridot, 1 mM spermidint, 5 mM DTT-t, 2 mM ATP-t, UTP-t, CTP-t és GTP-t, 20 µg *Sma*I-gyel kezelt templátplazmidot, 50 µg BSA-t, 1,78 egység PPIázt (pirofoszfát) és 10 µg, ily módon tisztított, His-címkével jelölt T7RNS-polimerázt tartalmaz. A reakciót 50 mM (végkoncentráció) EDTA (etilén-dinitro-tetraecetsav) hozzáadásával állítottuk le. Az így kapott mRNS-t fenol/kloroformmal extraháltuk, majd etanollal kicsaptuk. Ezt



követően RNS tisztítási reagenskészlettel (QIAGEN) tisztítottuk a gyártó útmutatása szerint.

### 11. példa

#### MFL mRNS készítése

Az MFL mRNS elkészítéséhez először is templátra volt szükség. Ehhez a következő DNS-szekvenciát készítettük el AUGUUCUUGUAA (amely fMet-Phe-Leu-Stop; formilmetionin-fenilalanin-leucin-stopkodon szekvenciába transzlatálódik, amelyet a továbbiakban MFL-nek nevezünk) a következők szerint. Egy A-oligonukleotidot (5'-TATgttcttgtaac) egy másik, B-oligonukleotiddal (5'-TCGAgttacaagaaca) párosítottunk, hogy *NdeI*- és *XhoI*-szekvenciát tartalmazó, kettős szálú DNS-t kapjunk. Ezt a DNS-t a pET29a-plazmidvektor (Novagen) *NdeI*- és *XhoI*-helyeibe klónoztuk. A képződő plazmidot ugyanúgy átírtuk, mint ahogy azt az előzőekben, a DHFR-génnél ismertettük.

### 12. példa

#### His-címkével jelölt aminoacil-tRNS-szintetáz-aktivitások

A His-címkével jelölt ARS-aktivitásokat (aminoacil-tRNS-szintetáz) a következőképpen mértük. Mindegyik reakciókeverék (50  $\mu$ l) 1 mM ATP-t, 2,8  $A_{260}$  egységnyi tRNS-keveréket (Boehringer), minden egyes jelölt aminosavból 50  $\mu$ M-t és mindegyik, tisztított, His-címkével jelölt ARS-t tartalmazó, polimix pufferből (lásd transzlációs kísérletek) állt. A reakciókat 37°C-on hajtottuk végre, és a radioaktív aminoacil-tRNS-eket 3MM-filterekre csaptuk ki különböző inkubációs időkben, majd hideg, 5%-os



triklórecetsavval mostuk, végül mértük a radioaktivitást. Egy aktivitásegység az az enzim mennyiség, amely egy perc alatt 1 pmól aminoacil-tRNS-t szintetizál. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

Enzim	Koncentráció ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Specifikus ak- tívitas (U/ $\mu\text{g}$ )	Szükséges egység (50 $\mu\text{l}$ reakció)
AlaRS	13	27	94
ArgRS	10	1300	130
AsnRS	30	ND	ND
AspRS	22	310	130
CysRS	25	500	31
GlnRS	36	330	63
GluRS	26	150	94
GlyRS	30	520	250
HisRS	30	1600	31
IleRS	20	63	130
LeuRS	22	940	190
LysRS	35	580	190
MetRS	27	3000	310
PheRS	23	15	63
ProRS	16	120	63
SerRS	17	1000	94
ThrRS	19	200	63
TrpRS	11	600	31
TyrRS	22	1800	31
ValRS	20	1700	156
MTF	12	230	230



His-címkével jelölt metionil-tRNS-transzformiláz-  
aktivitások

A His-címkével jelölt MTF-aktivitásokat a következőképpen vizsgáltuk ("\*" jelentése "His-címkével jelölt"). Mindegyik reakciókeverék (50  $\mu$ l) 1 mM ATP-t, 2,8 A<sub>260</sub> egységnyi tRNS-keveréket (Boehringer), 50  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-jelölt metionint, 0,5  $\mu$ g 10-formil-5,6,7,8-terahidrofólsavat, 3000 egység MetRS-t és MTF<sup>\*</sup>-et tartalmazó, polimix pufferből (lásd transzlációs kísérletek) állt. A reakciókat 37°C-on hajtottuk végre, és a nem formilált metionil-tRNS-eket deaciláltuk 0,175 M réz-szulfátot és 0,5 M Tris-HCl-t (pH 7,5) tartalmazó pufferben 8 percen keresztül, 30°C-on. A radioaktív formil-metionil-tRNS-eket 3MM-filterre csaptuk, majd hideg, 5%-os triklórecetsavval mostuk, végül mértük a radioaktivitást. Egy egység aktivitás az az enzimmennyiség, amely 1 perc alatt 1 pmól formil-metionil-tRNS szintetizálására képes. Az eredményeket a 2. táblázatban (az előző példában) mutatjuk be.

14. példa

Transzlációs kísérletek (általános eljárás)

A transzlációs keveréket (50  $\mu$ l) Jelenc és munkatársai (Jelenc és mtsai., 1979) és Wagner és munkatársai (Wagner és mtsai., 1982) által alkalmazott polimix puffer kisebb módosításával készítettük. A polimix puffer 5 mM magnézium-acetátot, 5 mM kálium-foszfátot (pH 7,3), 95 mM kálium-glutamátot, 5 mM ammónium-kloridot, 0,5 mM kalcium-kloridot, 1 mM spermidint, 8 mM putreszcint és 1 mM DTT-t tartalmaz. Mindegyik reakciókeverék 1 mM ATP-t, 1 mM GTP-t,



10 mM kreatin-foszfátot, 2,8 A<sub>260</sub> egységnyi tRNS-keveréket, 0,5 µg 10-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólsavat, 1 mM-t mindegyik aminosavból és a következőkben ismertetendő faktorkeveréket tartalmazta. Transzlációs reakcióval kapcsolt transzkripció esetében mindegyik NTP-ből 1 mM-t és 4 mM magnézium-acetátot is adtunk a fenti reakciókeverékhez. A faktor- és enzimmkeverék összetétele 12 pmól riboszóma, 1 µg IF1\*, 2 µg IF2\*, 0,75 µg IF3\*, 1 µg EF-G\*, 2 µg EF-Tu\*, 1 µg EF-Ts\*, 0,5 µg RF1\*, 0,5 µg RF3\*, 0,5 µg RRF\*, 30-300 egység mindegyik ARS\*-ből vagy MTF-ből, 0,2 µg kreatin-kináz (CK), 0,15 µg miokináz (MK) és 0,054 µg nukleozid-difoszfát-kináz\* (NDK). Transzlációs reakcióval kapcsolt transzkripció esetében 1,78 egység PPIázt és 0,5 µg T7RNS-polimerázt\* is adtunk hozzá. A csillag a His-címkével jelölt faktorokat és enzimeket jelenti. A reakciókeverékeket 37°C-on inkubáltuk 5 percen keresztül, majd templát DNS-t vagy RNS-t adtunk hozzá, és elindítottuk a reakciót. A transzlációt 37°C-on hajtottuk végre. A reakció befejeztével először a nagy molekulatömegű riboszómákat távolítottuk el 100 kDa vágású, ultraszűrő membránon történő szűréssel. Az ultraszűrt frakciót Ni-oszlopra töltöttük, így a His-címkéjű fúziós fehérjék eltávolíthatók. Az oszlopon keresztülhaladó komponens nagy tisztaságú transzlációs termék, amely SDS-PAGE-n egy sávot mutat. A következő kísérletekben alkalmazott S30-rendszert a Promegától vásároltuk, és a transzlációt a gyártó útmutatása szerint hajtottuk végre.



### 15. példa

#### Különböző fehérjék expressziója

A reakciórendszer His-címkével jelölt komponensei aktivitásának bizonyítása után *in vitro* fehérjeszintézisrendszert készítettünk a 14. példa szerint His-címkével jelölt T7RNS-polimeráz alkalmazásával. Ennek a szintézisrendszernek alkalmazásával *E. coli* DHFR,  $\lambda$ -lizozim, zöld fluoreszcens fehérje (GFP), glutation-transzferáz (GST) és T7-gén 10-es fehérjéje teljes hosszúságú polipeptidjeit szintetizáltuk meg, és mértük mindegyik termék hozamát. Az eredményeket a 13. ábrán mutatjuk be. Bizonyítottuk, hogy a találmány szerinti szintézisrendszer valamennyi, a transzlációhoz szükséges komponenst tartalmazza.

### 16. példa

#### Poli(U)-poli(Phe)-szintézis

Poli(U)-poli(Phe)-t szintetizáltunk *in vitro* reakciórendszerben. Mindegyik reakciókeverék 1 mM ATP-t, 1 mM GTP-t, 10 mM kreatin-foszfátot, 2,8  $A_{260}$  egységnyi tRNS-keveréket, 1 mM [ $^{14}C$ ]-jelölt fenilalanint tartalmazó polimix puffert és a faktorkeveréket tartalmazta. A faktorkeverék összetétele 12 pmól riboszóma, 1  $\mu$ g EF-G\*, 2  $\mu$ g EF-Tu\*, 1  $\mu$ g EF-Ts\*, 60 egység PheRS\*, 0,2  $\mu$ g kreatin-kináz (CK), 0,15  $\mu$ g miokináz (MK) és 0,054  $\mu$ g nukleozid-difoszfát-kináz\* (NDK\*). A csillag a His-címkével jelölt faktorokat és enzimeket jelenti. A reakciókeverékeket 37°C-on inkubáltuk 5 percen keresztül, majd 5  $\mu$ g poli(U)-t adtunk hozzá, és a reakciót elindítottuk. A reakció során 8  $\mu$ l-es mintákat vettünk, amelyeket 3MM-filterekre vittünk



10% triklórecetsavval. Az aminoacil-tRNS-eket 85°C-on deaciláltuk, majd 10% triklórecetsavval mostuk, végül mértük a radioaktivitást. A céltermék képződését ily módon bizonyítottuk.

Az előzőek szerinti transzlációs reakciókban az EF-G\*, EF-Tu\* és EF-Ts\* optimális koncentrációit az *in vitro* reakciórendszerben a poli(Phe)-hozammal vizsgáltuk azonos körülmények között, de az elongációs faktorok változó koncentrációival. Az eredményeket a 7A ábrán mutatjuk be. A 7A ábrán a • az EF-G\*, a ▲ az EF-Tu\* és a ■ az EF-Ts\* adatait ábrázolja.

Az előzőekben ismertetett, találmány szerinti reakciórendszerben a poli(Phe)-szintézis adatait összehasonlítottuk az S100-kivonat alkalmazásával történő transzlációs rendszer adataival. Az eredményeket a 7(B) ábrán mutatjuk be. Ez utóbbi rendszerben (o) a reakció 20 perc elteltével megállt, míg a találmány szerinti rendszerben (●) a reakció még 40 perc elteltével is tovább folyt.

### 17. példa

#### Terminációs faktorok és riboszóma helyreállító faktor aktivitásai

A terminációs faktorok (RF1\*, RF3\*, RRF\*; "\*" jelentése "His-címkével jelölt") aktivitásait Pavrov és munkatársai (8) szerint mértük kis módosítással. A reakciókeveréket (50  $\mu$ l) a transzlációs rendszerben használt polimix pufferből kiindulva készítettük. Mindegyik reakciókeverék 1 mM ATP-t, 1 mM GTP-t, 2,8 A<sub>260</sub> egységnyi tRNS-keveréket, 1 mM fenilalanint és leucint, 50 pmól, [<sup>35</sup>S] radioaktív metionin



alkalmazásával készített formil-metionil-tRNS-t és a His-címkével jelölt faktor- és enzimkeveréket (később ismertetjük) tartalmazott. A faktor- és enzimkeverék összetétele 12 pmól riboszóma, 1  $\mu\text{g}$  IF1<sup>\*</sup>, 2  $\mu\text{g}$  IF2<sup>\*</sup>, 0,75  $\mu\text{g}$  IF3<sup>\*</sup>, 1  $\mu\text{g}$  EF-G<sup>\*</sup>, 2  $\mu\text{g}$  EF-Tu<sup>\*</sup>, 1  $\mu\text{g}$  EF-Ts<sup>\*</sup>, 0,5  $\mu\text{g}$  RF1<sup>\*</sup>, 0,5  $\mu\text{g}$  RF3<sup>\*</sup>, 0,5  $\mu\text{g}$  RRF<sup>\*</sup>, 50 egység PheRS<sup>\*</sup> és 300 egység LeuRS<sup>\*</sup>. Az RF1<sup>\*</sup>-et, az RF3<sup>\*</sup>-at vagy az RRF<sup>\*</sup>-et kívánt esetben kihagytuk a faktor- és enzimkeverékből. A reakciókeverékeket 37°C-on 5 percen keresztül előinkubáltuk, majd 1  $\mu\text{g}$  MFL mRNS-t adtunk hozzá, hogy a transzlációt elindítsuk. A reakciókeverékből időnként 5  $\mu\text{l}$ -es mintákat vettünk, és a reakció leállítása érdekében a mintákhoz azonos térfogatú 1 N sósavat adtunk. Ezek után 200  $\mu\text{l}$  etil-acetátot adtunk a tripeptid (fMFL) lemosása érdekében, majd a radioaktivitást folyadék-szcintillációs számlálóban mértük.

Az RF1<sup>\*</sup>, RF3<sup>\*</sup> és RRF<sup>\*</sup> terminációs faktorok aktivitását *in vitro* transzlációs rendszerben mértük fMet-Phe-Leu-Stop (fMFL) szekvenciát kódoló szintetikus mRNS-sel. Konkrétan, fMFL mRNS-t transzlatáltunk terminációs faktorként RF1<sup>\*</sup>-et, RF3<sup>\*</sup>-at és RRF<sup>\*</sup>-et (●), RF1<sup>\*</sup>-et és RRF<sup>\*</sup>-et (·), RF1<sup>\*</sup>-et és RF3<sup>\*</sup>-at (▲), egyedül RF1<sup>\*</sup>-et (■), RF3<sup>\*</sup>-at és RRF<sup>\*</sup>-et (○) tartalmazó rendszerekben és minden terminációs faktortól mentes (RRF<sup>\*</sup> is) rendszerben (◆), és mértük a hozamokat. A 4. ábrán mutatjuk be az eredményeket. A 4. ábrán az első ciklusban szintetizált peptid körülbelül 1000 cpm-nek felel meg az y-tengelyen. Az RF1<sup>\*</sup>-et, RF3<sup>\*</sup>-at és RRF<sup>\*</sup>-et (●) tartalmazó rendszerben az fMFL-hozam lineárisan növekedik az időben, amely azt jelzi, hogy az RF1<sup>\*</sup>, RF3<sup>\*</sup> és RRF<sup>\*</sup>-nek más



rendszerekhez hasonló az aktivitása. Abban a rendszerben, amely RF1<sup>+</sup>-et nem tartalmazott (o) peptidszintézis nem történt. Az RRF<sup>+</sup>-et nem tartalmazó rendszerekben (▲■◆) a riboszóma helyreállítása nem történt meg.

### 18. példa

#### DHFR-szintézis

[<sup>35</sup>S]-metionint tartalmazó DHFR-t szintetizáltunk a találmány szerinti, *in vitro* transzlációs rendszerrel, és más transzlációs rendszerrel S30-rendszer (Promega) alkalmazásával. Mindegyik terméket 12%-os SDS-PAGE-n (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézis) futtattuk, és BAS-1000 rendszerrel (Fuji Film) mutattuk ki, majd mértük a radioaktivitást. A 8(A) ábrán mutatjuk be az SDS-PAGE-n történő elválasztás eredményeit.

Egy másik módon a DHFR-aktivitást a következőképpen is mértük. A DHFR-t 50 mM kálium-foszfát puffert (pH 7,0), 50 μM DHF-et (dihidrofólsav) és 60 μM NADPH-t (redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) tartalmazó reakciókeverékben szintetizáltuk 30°C-on, és percenként mértük az A<sub>340</sub> érték csökkenését. Az eredményeket a 8(b) ábrán mutatjuk be.

A 9. ábrán mutatjuk be a találmány szerinti *in vitro* transzlációs rendszerben és az S30-rendszerben történő reakciós folyamatokat. A találmány szerinti *in vitro* transzlációs rendszerben (■) a reakció még 120 perc múlva is tovább folyik, míg az S30-rendszerben (●) a DHFR-hozam 20 perc múlva eléri a maximumát.

Az energiafogyasztás vizsgálata érdekében nukleozid-trifoszfátot hidrolizáltunk a találmány szerinti, *in vitro* transzlációs rendszerben és az S30-rendszerben. A hidrolízist a következőkben ismerttetendő módon követtük nyomon mindkét rendszerben, és az adatokat összehasonlítottuk. DHFR-Templátok alkalmazásával a transzlációt [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP-t vagy GTP-t tartalmazó reakciókeverékben végeztük 37°C-on. Mindegyik reakciókeverékből 2  $\mu$ l-es mintákat vettünk különböző időpontokban, és a mintákhoz 150  $\mu$ l 10%-os hangyasavat adtunk. A keverékeket polietilénimin VRK-lemezekre (vékonyréteg-kromatográfiás lemezekre) vittük, és a reakciótermékeket 0,75 M kálium-foszfát pufferben (pH 3,75) fejlesztettük ki. Levegőn történő szárítást követően a VRK-lemezeket műanyag fóliával becsomagoltuk és autoradiográfiás mérést végeztünk. A 10. ábrán mutatjuk be az eredményeket, ahol az S30-rendszerből kapott adatok bal oldalon láthatók, míg a találmány szerinti rendszer adatai jobb oldalon találhatóak. Az S30-rendszerben az ATP az idő folyamán csökken, míg a találmány szerinti rendszerben az ATP mennyisége csaknem állandó szinten marad.

A szintetizált DHFR tisztítása érdekében először a riboszómákat távolítottuk el 100 kDa vágású, ultraszűrő membránon történő szűréssel. Ezt követően a reakciórendszert alkotó valamennyi, His-címkével jelölt komponenst távolítottuk el a reakciós keveréknek nikkell-oszlopon történő átengedésével. A nikkell-oszlopon történő átengedés előtti reakciókeveréket és az azt követően kapott terméket 12%-os SDS-PAGE-n vizsgáltuk, és a gélt Coomassie Blue festékkel

festettük. A 14. ábrán mutatjuk be az eredményeket, ahol az 1. sáv a marker, a 2. sáv a reakciókeverék, a 3. sáv a termék (DHFR). Látható, hogy a termék egyetlen sávban jelenik meg.

### 19. példa

#### Valin beépülés valil-szuppresszor-tRNS-sel (nem természetes aminosavak beépülésének modellje)

A találmány szerinti, *in vitro* transzlációs rendszerben, amely RF1<sup>\*</sup> helyett RF2<sup>\*</sup>-t tartalmaz ("\*" jelentése "His-címkével jelölt") terminációs faktorként, olyan DHFR-templátot, amelyben a 37. helyzetben lévő Asn kodonját (ATA kodon) UAG kodonná alakítjuk, transzlatáltunk kémiai úton szintetizált valil-szuppresszor-tRNS-sel. Ennek eredményeképpen a 37. aminosavnál végződő, csonka fehérje szintetizálódott az RF1<sup>\*</sup>-et tartalmazó mintában (11. ábra, 2. sáv), míg ennek a csonka fehérjének tulajdonítható, halvány sáv figyelhető meg az RF1<sup>\*</sup>-mentes rendszerben (amely nem tartalmaz RF2<sup>\*</sup>-t) (11. ábra, 3. sáv). RF2<sup>\*</sup> beépítésével fehérjetermék figyelhető meg (11. ábra, 4. sáv) ugyanazon helyzetben, mint a normál DHFR (11. ábra, 1. sáv). Ezen eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a szuppresszor-tRNS-hez kapcsolt valin beépült a DHFR 37. helyzetébe.

#### Ipari alkalmazhatóság

Egy reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek jelölésével a reakciórendszert alkotó egyedi fehérjekomponensek biztonságosan tisztíthatók, és így olyan reakciórendszer alakítható ki, amelyben nincsen ismeretlen szennyező anyag.

Továbbá, egy ily módon szintetizált célfehérje könnyen izolálható nagy tisztaságban.

Kimutatták, hogy sejtekben és sejtkivonatokban lévő lipopoliszacharidok (LPS) endotoxinokként különböző, nem kívánatos hatásokat fejtenek ki az élő szervezetben, azonban velük kapcsolatban az a technológiai probléma áll fent, hogy az LPS-ek nehezen választhatók el a kívánt peptidtermékektől. Ez a probléma a találmány szerinti, *in vitro* peptidszintézis-rendszerrel kiküszöbölhető.

Minden ismeretlen komponenstől mentes reakciórendszer kialakításával a reakció hosszú időn keresztül, például 2 órán keresztül vagy akár tovább is folytatható "batch" rendszerben. Elméletileg lehetséges a reakciókeverék térfogatának növelése is.

"Flow" rendszer alkalmazásakor a reakció ennél hosszabb ideig végezhető, amellyel a fehérje gyakorlati termelése és tisztítása megvalósítható egy *in vitro* reakciórendszerben. Ezzel az eljárással tehát bizonyos enzimek, amelyeket magas árak miatt nem szívesen alkalmaztak orvosi kezeléseknél, gazdaságosan előállíthatók. Ennek eredményeképpen olyan orvosi kezelések felhasználási területe szélesíthető ki, ahol a bejuttatás problematikus a bejuttatás miatt, és így legalább részbeni helyettesítőként enzimet adagolhatnak.

A találmány szerint, terminációs faktorokat tartalmazó és terminációs faktoroktól mentes rendszer alakítható ki, és riboszómaprezentációk könnyen és szelektíven előál-



líthatók. Ezen kívül nem természetes aminosavak még pontosabb beépítése válik lehetségessé a kívánt helyzetekbe.

A hagyományos, prokarióta sejtek kivonatával dolgozó, sejtmentes fehérjeszintézis-rendszereknél az a probléma, hogy az mRNS stabilitása jelentősen csökken, ha a transzkripció és a transzláció nem egy időben megy végbe. Ezzel szemben a találmány szerinti reakciórendszerben az mRNS stabilan transzlatálódik.

A genomanalízisek befejeződése után a molekuláris biológiai vizsgálatok fő irányvonala a génvizsgálatok felé tolódik el. Ilyen körülmények között a találmány szerinti reakciórendszer, amely meggyorsítja a génexpressziót és a fehérjetermékek azonosítását, ezáltal elősegíti a génműködések vizsgálatát, jelentős mértékben hozzájárul a tudományos technológia fejlődéséhez.

#### Hivatkozások

- 1) Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D., and Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31, 371-87.
- 2) Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411, 177-84.
- 3) Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.



SZEKVENCIALISTA

(210) 1

(211) 14

(212) PRT

(213) *marha sp.*

(400) 1

Ser AsnLys Glu Gln Glu Pro Lys Glu Lys Lys Lys Ls Lys

1

5

10

(210) 2

(211) 9

(212) PRT

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) *sztreptavidinhez kötődő sztrep-címke*

(221) *kevert sajáttság*

(222) (1)...(9)

(223) Schmidt & Skerra, 1993 „The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a function IgFv fragment”, *Protein Eng.*, 6 (1): 109-122

(400) 2

Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1

5



- (210) 3  
(211) 9  
(212) PRT  
(213) *mesterséges szekvencia*
- (220)  
(223) sztreptavidinhez kötődő sztrep-címke  
(220)  
(221) kevert sajáttság  
(222) (1)...(9)  
(223) Schmidt és társai, 1996: „Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin”, J. of Mol. Biol. 255 (5): 753-766
- (400) 1  
Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
1 5
- (210) 4  
(211) 12  
(212) RNA  
(213) *mesterséges szekvencia*
- (220)  
(223) RNS szekvencia az MFL mRNS-hez alkalmazható  
templát előállításához  
(220)  
(221) mRNS  
(222) (1)...(12)

(223)

(400) 4

auguucuugu aa

(210) 5

(211) 14

(212) DNA

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) A-oligonukleotid, amely a 6. azonosítószámú szekvenciához hibridizálódva kettősszálú, NdeI és XhoI-szekvenciákat tartalmazó DNS-t alkot

(400) 5

tatggtcttg taac

(210) 6

(211) 16

(212) DNA

(213) *mesterséges szekvencia*

(220)

(223) B-oligonukleotid, amely az 5. azonosítószámú szekvenciához hibridizálódva kettősszálú, NdeI és XhoI-szekvenciákat tartalmazó DNS-t alkot

(400) 6

tcgagttaca agaaca



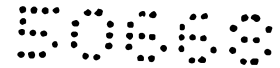
## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására olyan reakciórendszer alkalmazásával, amely DNS-nek RNS-sé történő átírását, majd az előállított RNS transzlatálását foglalja magában, vagy olyan reakciórendszer alkalmazásával, amely RNS *in vitro* transzlatálását foglalja magában, *azzal jellemezve*, hogy a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részét vagy valamennyi elemét egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelöljük, és az anyagpár másik tagját adszorbensként alkalmazzuk a jelölt fehérjekomponensek megfogására a transzlációt követően.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy többféle anyagkombinációt alkalmazunk a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részének vagy valamennyi elemének jelölésére és adszorbensként a jelölt fehérjekomponensek megfogására.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával fehérjekomponensekként a transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges valamennyi faktort vagy enzimet vagy csak egy részüket jelöljük.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a transzkripció vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorokként vagy enzimekként az alábbiak bármelyikét alkal-



mazzuk: iniciációs faktorok, elongációs faktorok, terminációs faktorok, aminoacil-tRNS-szintetáz, metionil-tRNS-transzformiláz és RNS-polimeráz.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával fehérjekomponensekként a transzkripciós vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktorokat vagy enzimeket és más, a reakciórendszer kialakításához szükséges enzimeket jelöljük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a reakciórendszer kialakításához szükséges, a transzkripciós vagy transzlációs reakcióhoz szükséges faktoroktól vagy enzimektől különböző enzimekként a reakciórendszerben az energia regenerálásához szükséges enzimeket, vagy a transzkripciós vagy transzlációs reakcióban képződő, szervesetlen pirofoszforsav hidrolizálásához szükséges enzimeket alkalmazunk

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az egy DNS-nek RNS-sé történő átírását, majd az előállított RNS transzlatálását magában foglaló, vagy egy RNS *in vitro* transzlatálását magában foglaló reakciórendszerként terminációs faktoroktól mentes reakciórendszert alkalmazunk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egymáshoz kapcsolódó anyagpárként affinitáskromatográfiában kölcsönösen kölcsönhatásba lépő anyagokat alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az affinitáskromatográfiában kölcsönösen kölcsönhatásba lépő anyagokként az alábbi anyagkombinációk bármelyikét alkalmazzuk: egy fehérje vagy peptidfragmens és egy fémion között, egy antigén és ellenanyag között, egy fehérje és egy másik fehérje vagy peptidfragmens között, egy fehérje és specifikus, kis molekulatömegű vegyületek, például aminosavak, DNS-ek, festékek, vitaminok és lektinek között, egy fehérje és egy szacharid között vagy egy fehérje vagy peptidfragmens és egy ioncserélő gyanta között kötést kialakítani képes anyagok.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy fehérje vagy peptidfragmens és fémion között kötést kialakító anyagok kombinációjaként hisztidin-címkét és nikkelkomplexet vagy kobalt-komplexet alkalmazunk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás peptid vagy peptidszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egymáshoz kapcsolódó anyagpárként mágnesesen egymáshoz kapcsolódó anyagokat alkalmazunk.

12. Fehérjekomponensek készlete peptid vagy peptidszármazék előállítására szolgáló olyan reakciórendszerhez, amely egy DNS-nek RNS-sé történő átírását, majd az előállított RNS transzlatálását foglalja magában, vagy olyan reakciórendszer alkalmazásával, amely egy RNS *in vitro* transzlatálását foglalja magában, és a készlete a reakciórendszert alkotó valamennyi fehérjekomponenst tartalmazza vagy csak egy részüket, és a fehérjekomponensek az alábbiak közül egy vagy több: az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölt enzimek és faktorok.

13. Fehérjekomponensek 12. igénypont szerinti készlete, ahol a fehérjekomponensek a transzkripcióhoz vagy translációhoz szükséges faktorok vagy enzimek, és a reakciórendszer kialakításához szükséges más enzimek közül egy vagy több.

14. Fehérjekomponensek 13. igénypont szerinti készlete, ahol a transzkripcióhoz vagy translációhoz szükséges faktorok vagy enzimek az alábbiak közül egy vagy több: iniciációs faktorok, elongációs faktorok, terminációs faktorok, aminoacil-tRNS-szintetáz, metionil-tRNS-transzformiláz és RNS-polimeráz.

15. Fehérjekomponensek 13. igénypont szerinti készlete, ahol a reakciórendszer kialakításához szükséges enzimek a transzkripciós vagy translációs reakcióhoz szükséges faktoroktól vagy enzimektől különböző enzimek, és ezek az enzimek a reakciórendszerben az energia regenerálásához szükséges enzimek vagy a transzkripciós vagy translációs

reakcióban képződő, szervesetlen pirofoszforsav hidrolizálásához szükséges enzimek.

16. Fehérjekomponensek 12. igénypont szerinti készlete, amely az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával jelölt fehérjekomponens megfogásához adszorbenst tartalmaz.

17. Fehérjekomponensek 12. igénypont szerinti készlete, amely a reakciórendszert alkotó fehérjekomponensek egy részének vagy valamennyi elemének az egymáshoz kapcsolódó anyagpár egyik tagjával történő jelölésére alkalmazott anyag és az adszorbensként a jelölt fehérjekomponensek megfogására alkalmazott anyag által alkotott többféle anyagkombinációt vagy párjt tartalmaz.

18. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított termék.

89-12=

101



100506

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

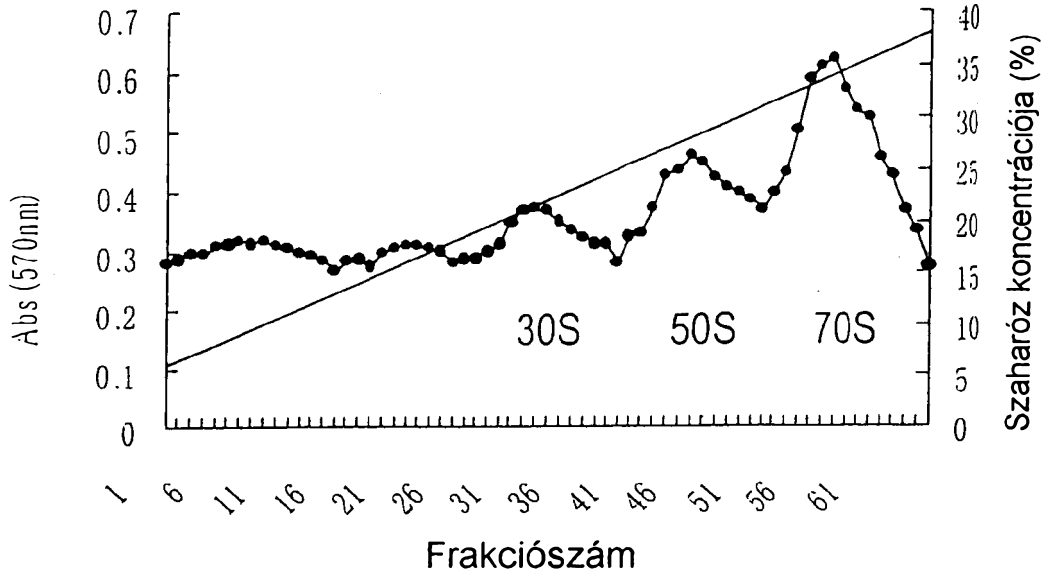
pp 301723

50666

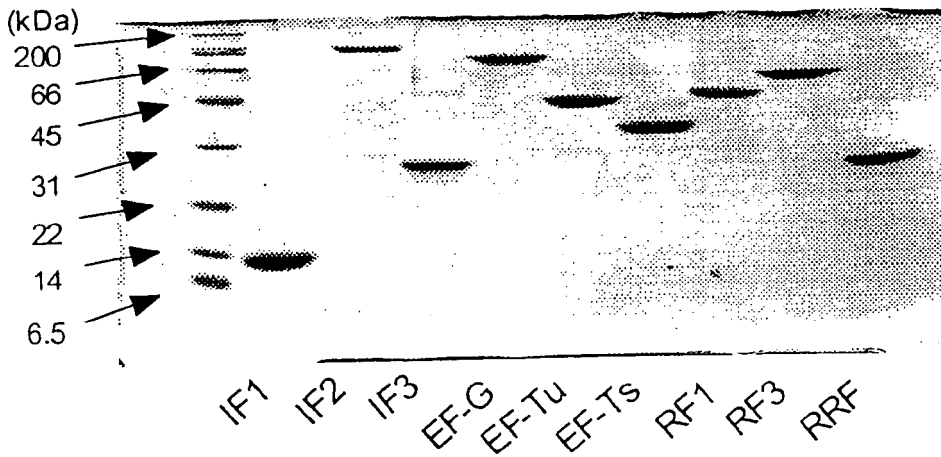
PCT/JP01/10682

1/12

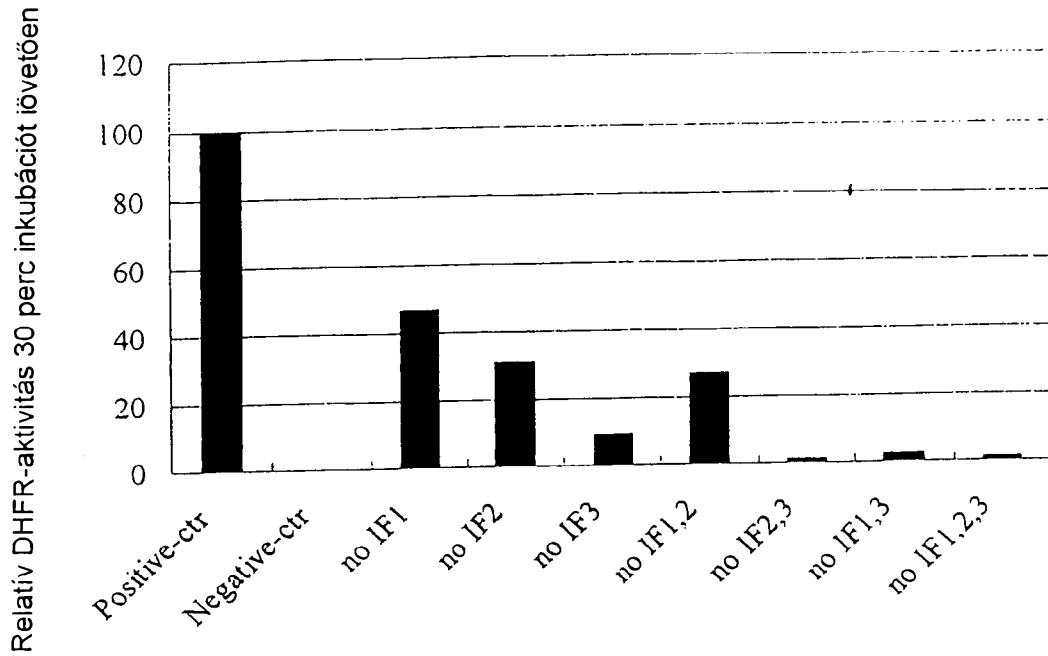
1. ábra



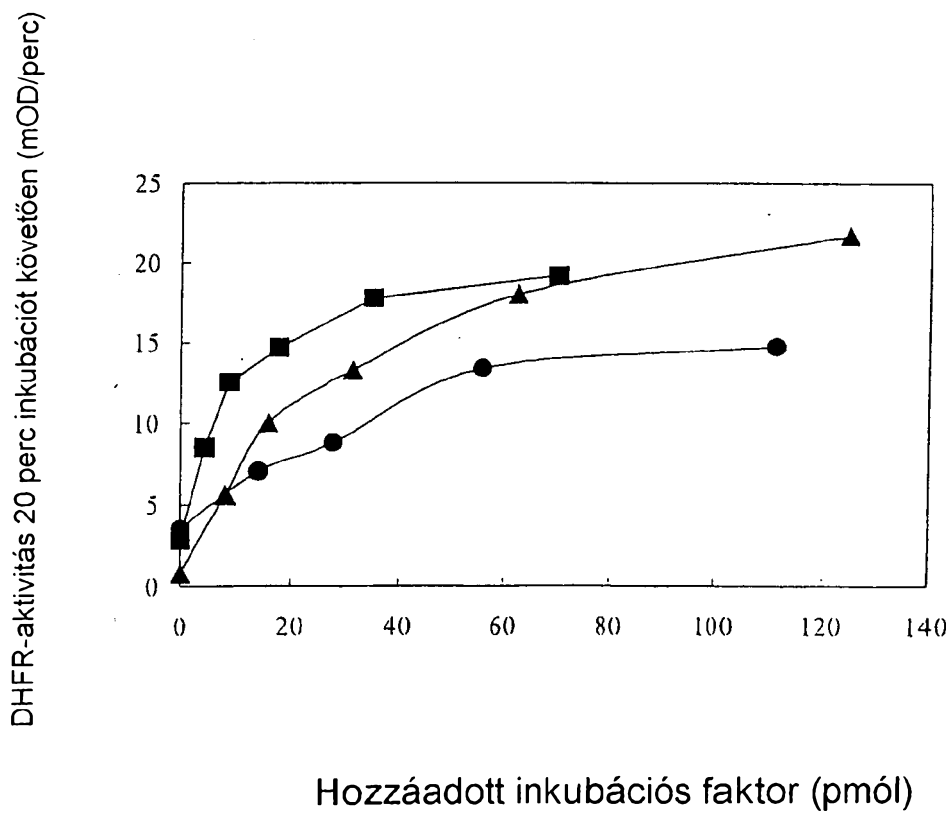
2. ábra



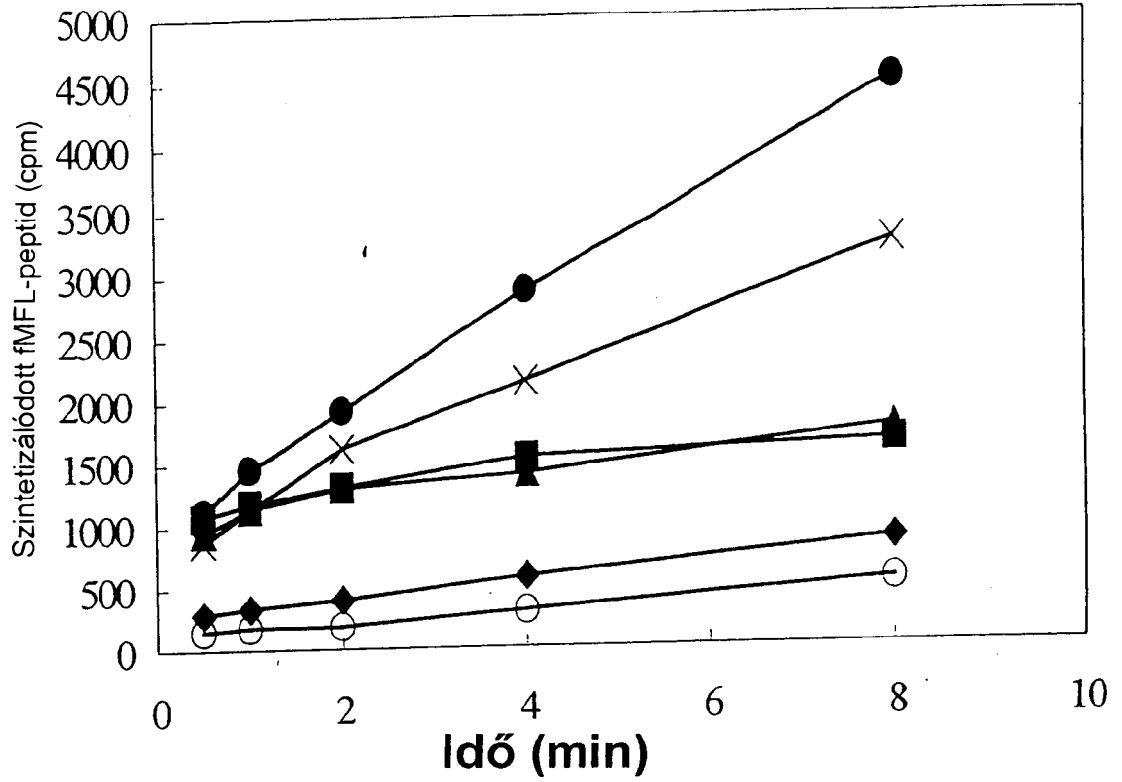
3A ábra



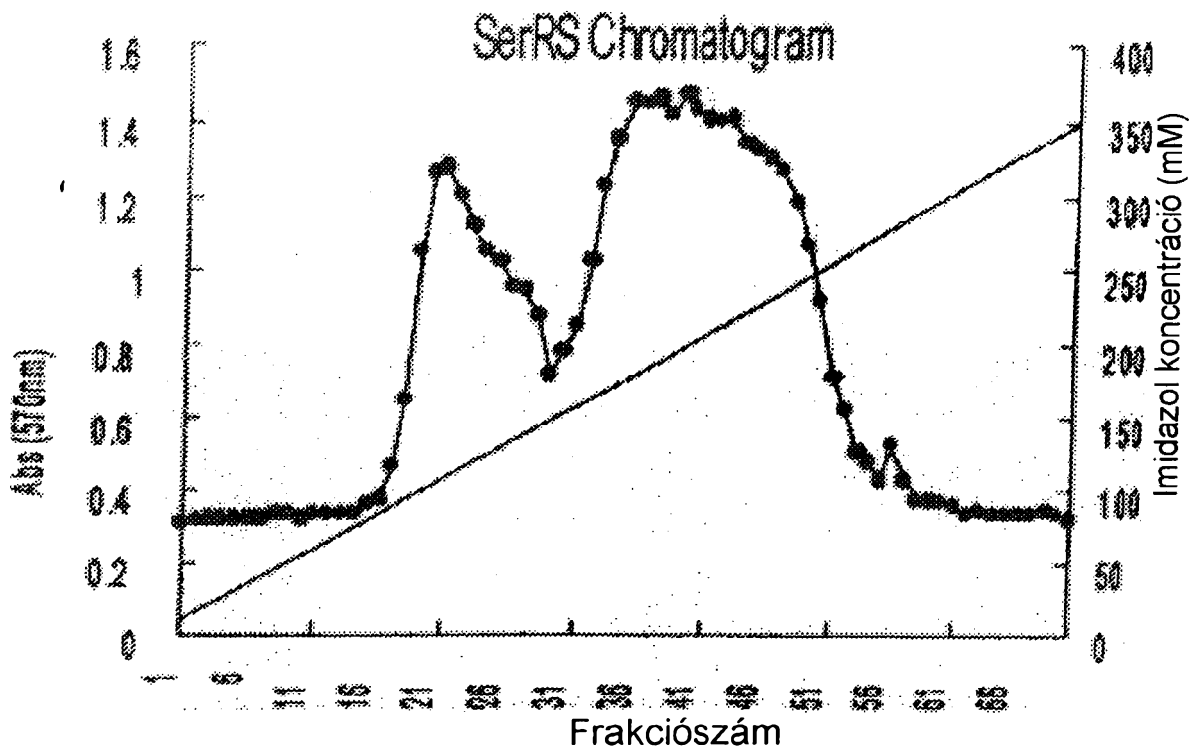
3B ábra



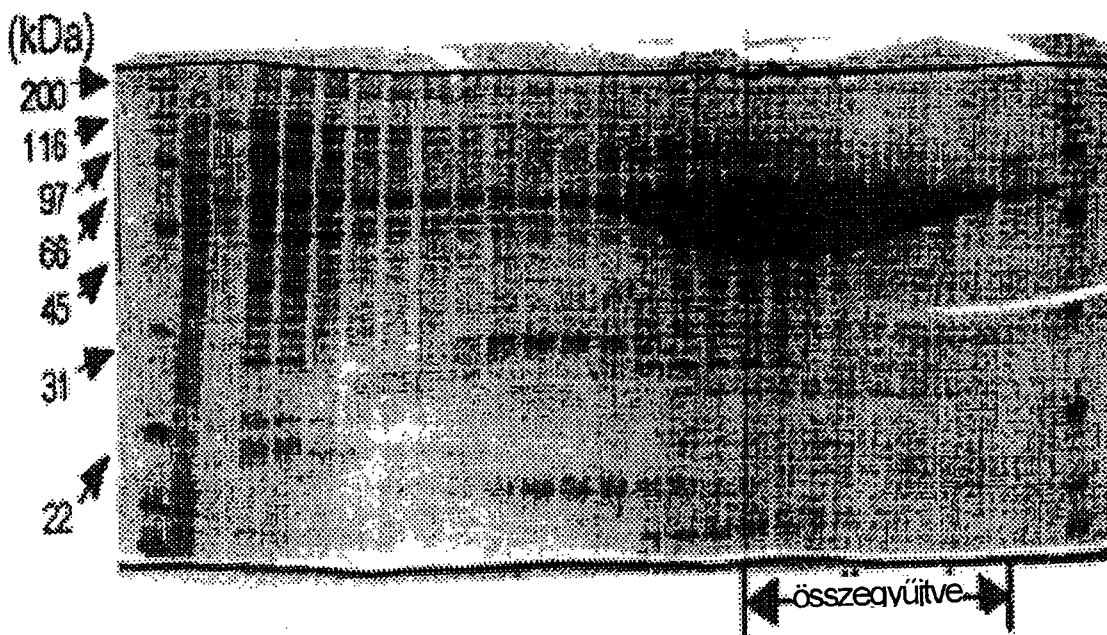
4. ábra



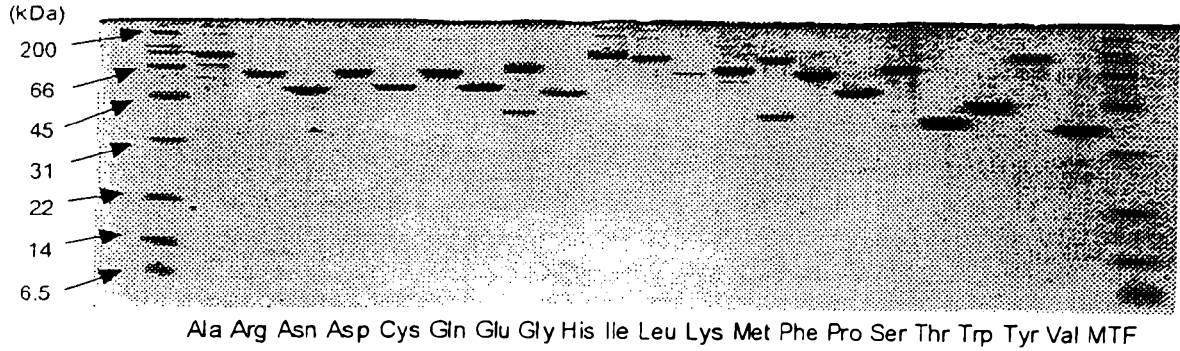
5A ábra



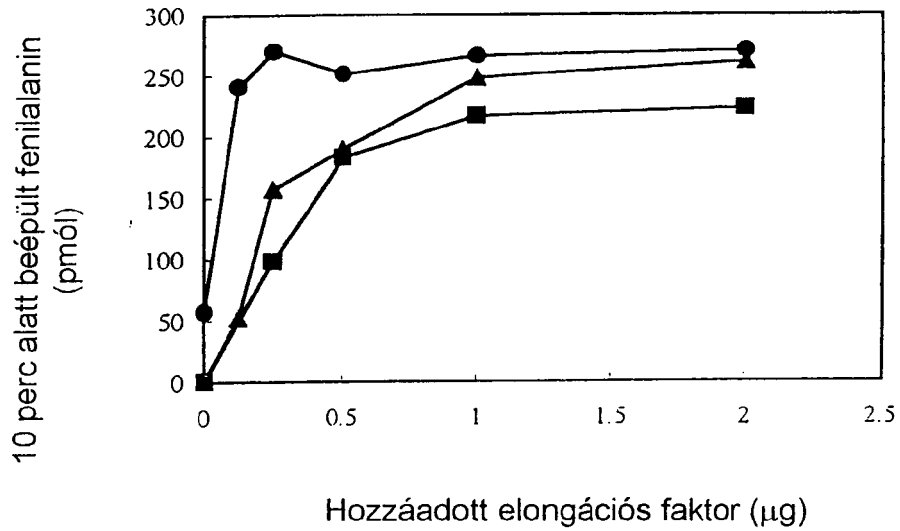
5B ábra



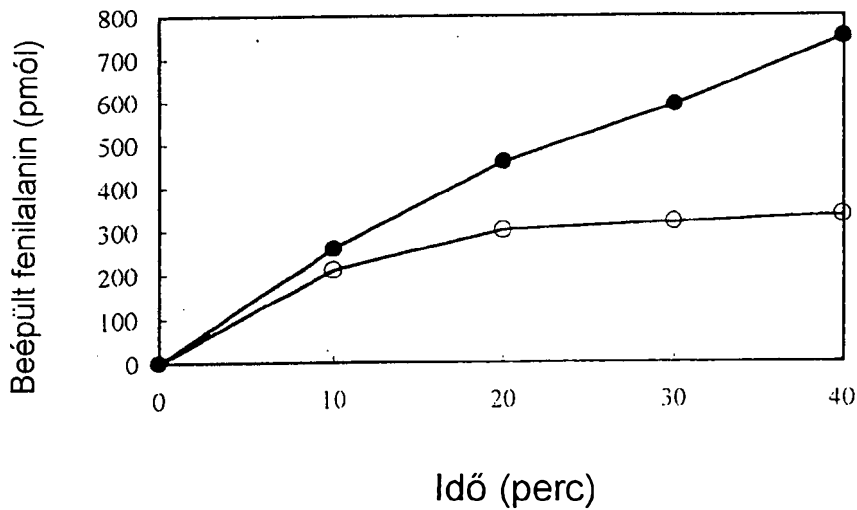
6. ábra



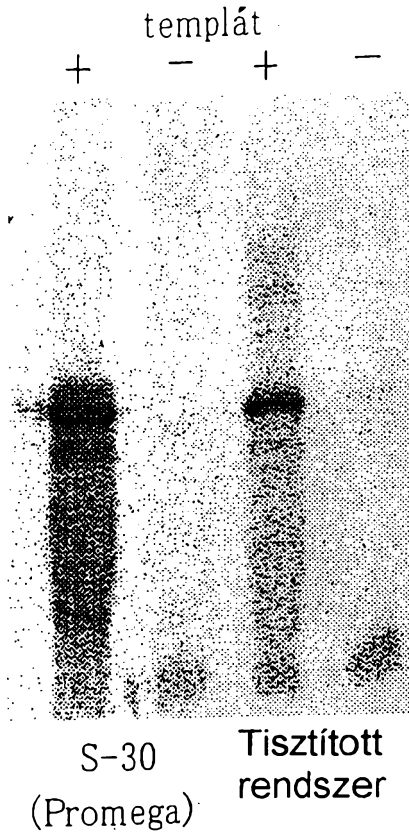
7A ábra



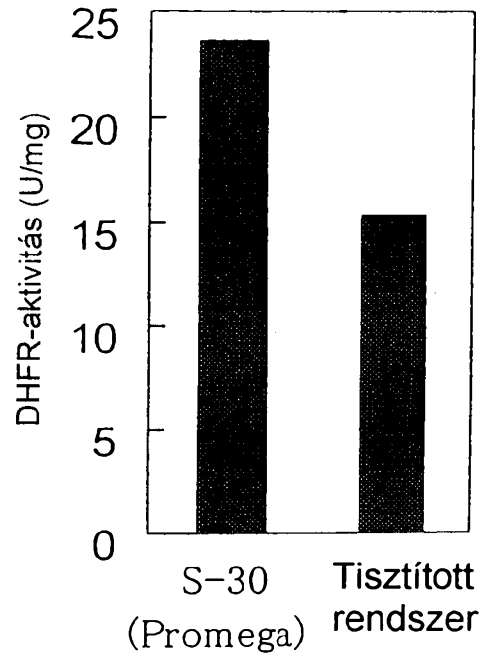
7B ábra



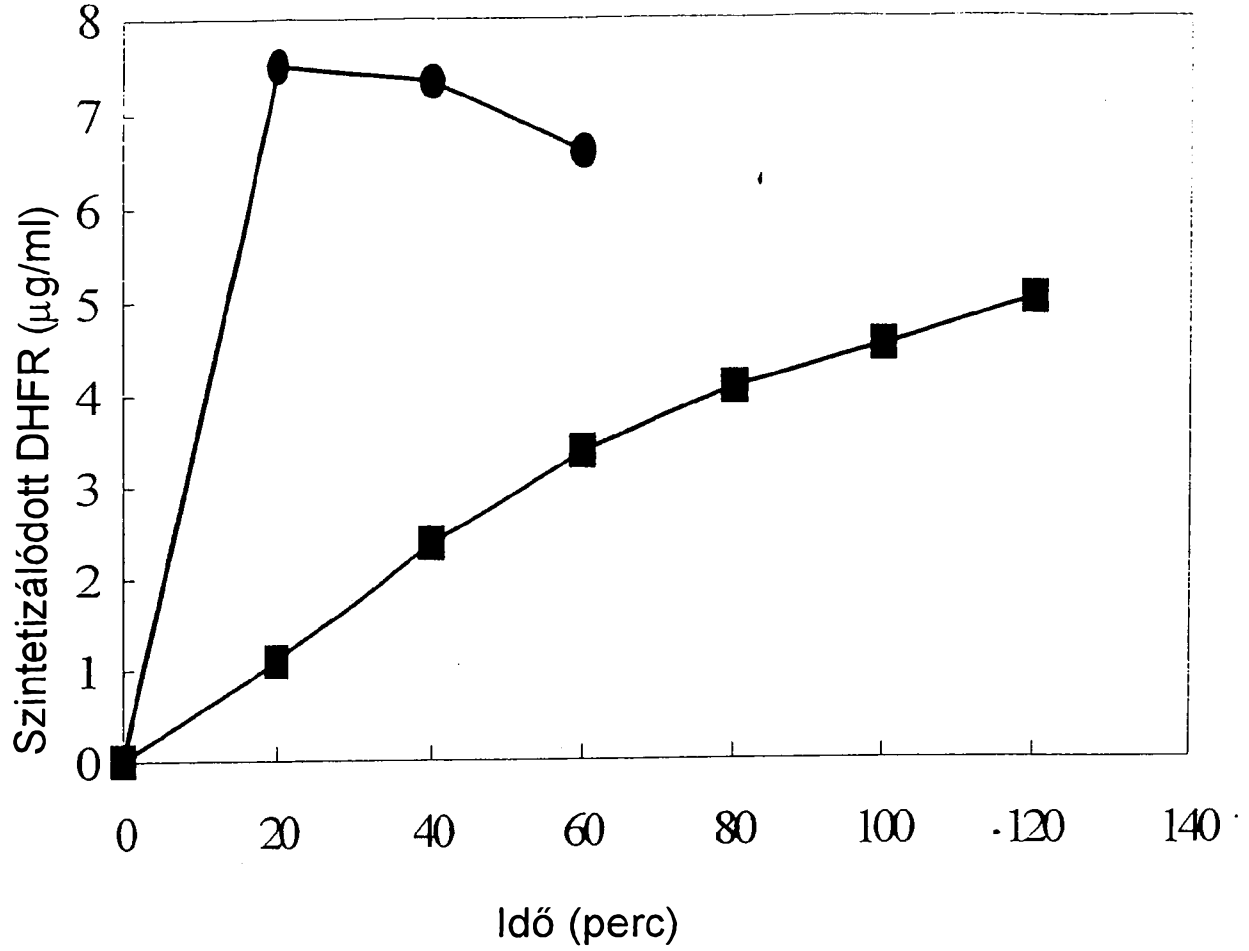
8A ábra



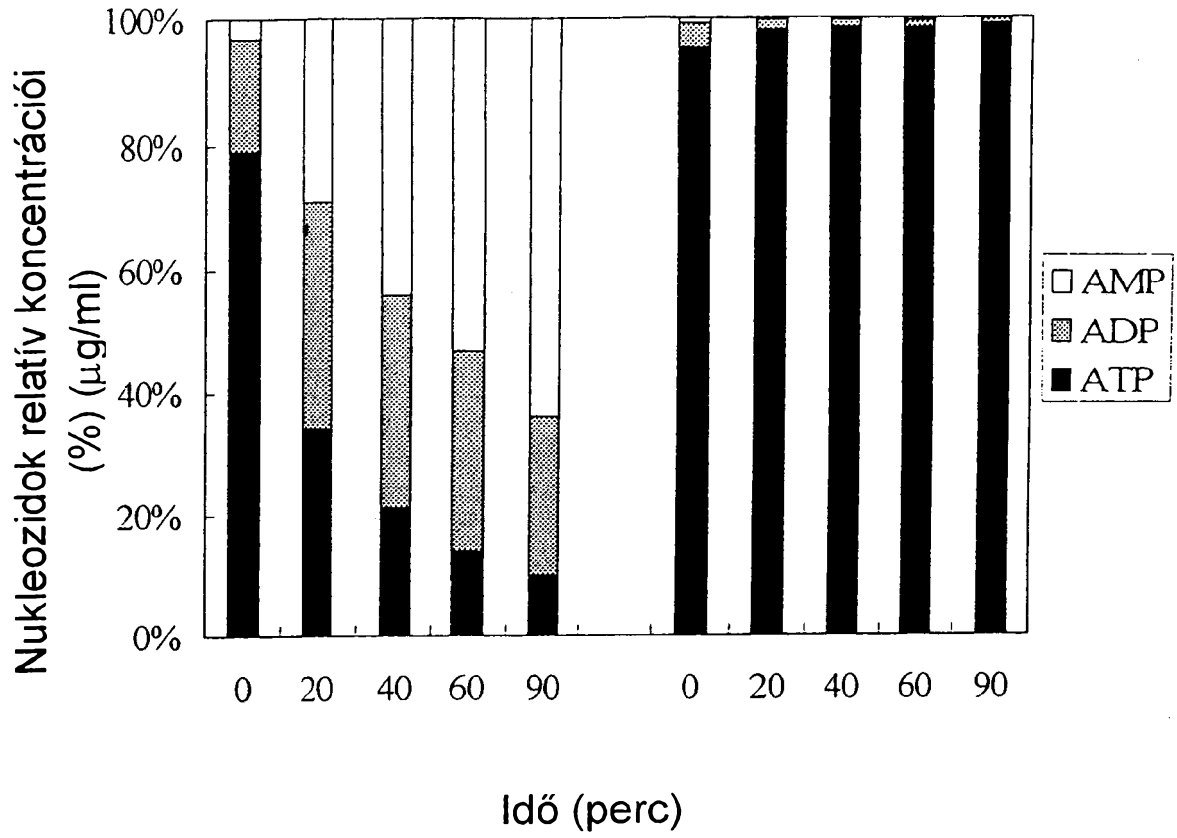
8B ábra



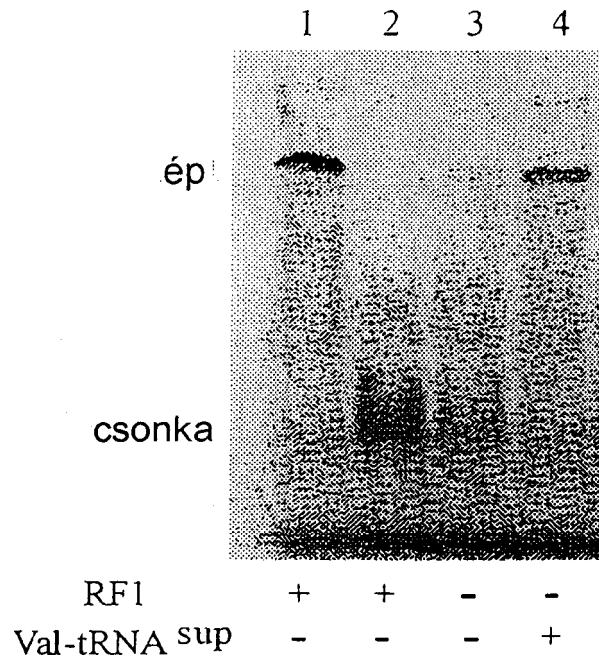
9. ábra

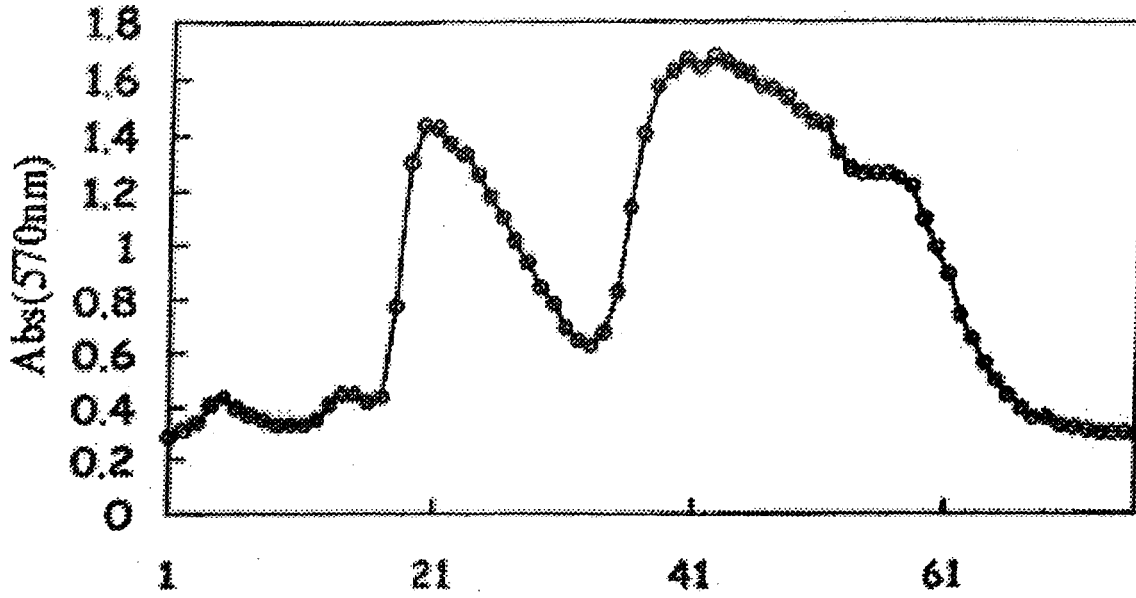


10. ábra



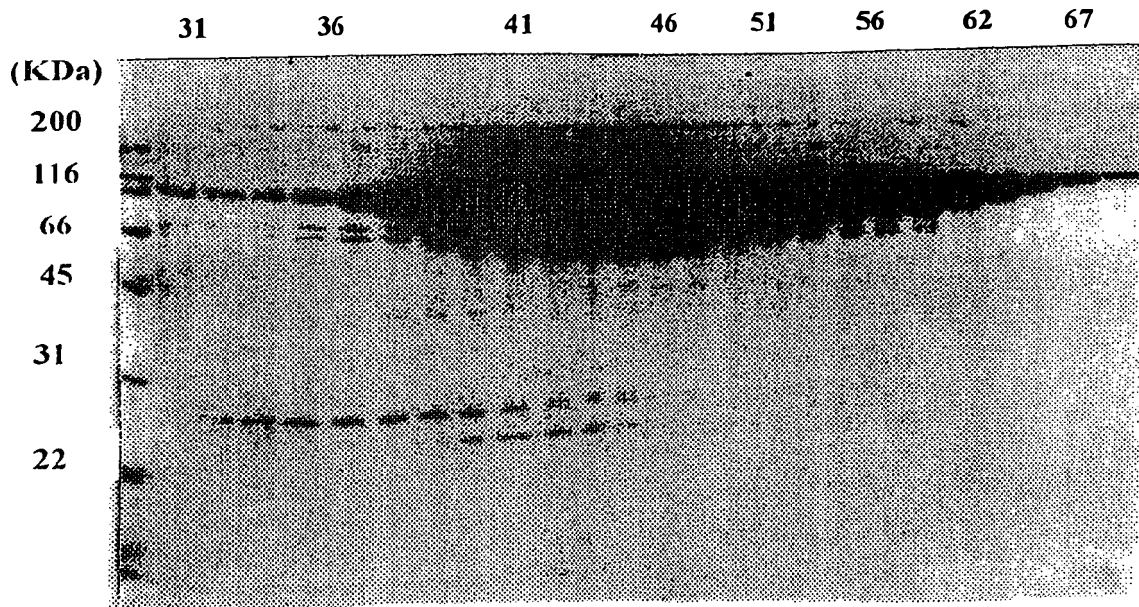
## 11. ábra





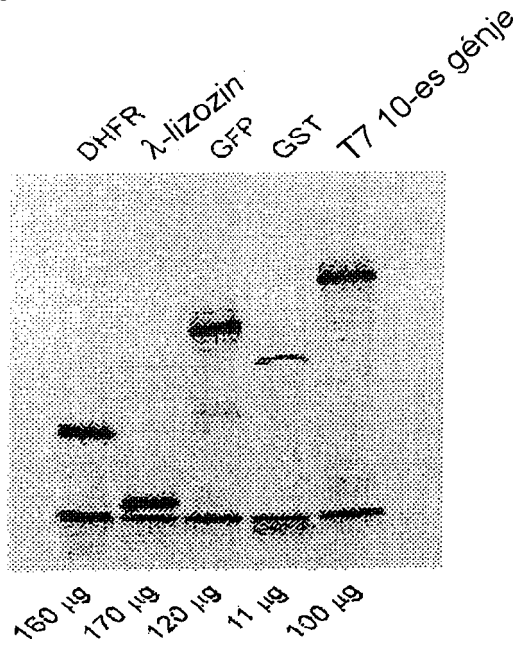
12A ábra

Frakciós szám

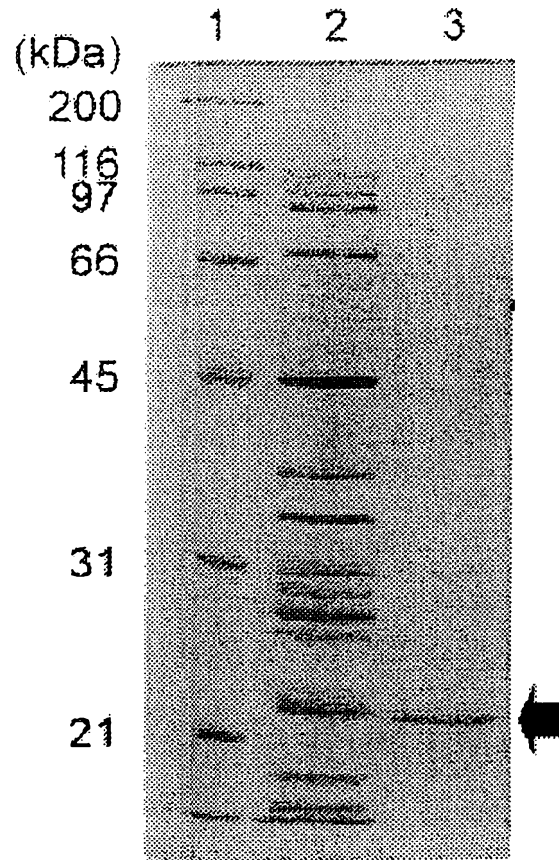


12B ábra

← összegyűjtve →



13. ábra



14. áb ra