

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 953422 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **953422**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.07.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.07.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.01.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

13.07.1994 JP 6-161053 P

13.09.1994 JP 6-218392 P

07.12.1994 JP 6-303809 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Sankyo Company Limited, 5-1, Nihonbashi Honcho, 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103, JAPAN, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Tohru, Takahashi, Tokyo 140, JAPAN, (JP)

2 •Ryuta, Koishi, Tokyo 140, JAPAN, (JP)

3 •Ichiro, Kawashima, Tokyo 140, JAPAN, (JP)

4 •Nobufusa, Serizawa, Tokyo 140, JAPAN, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Forssén & Salomaa Oy, Lautatarhankatu 8 B, 00580 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Autolysoivia fuusioproteiineja hyväksikäyttävät ilmentämisjärjestelmät ja uusi pelkistävä polypeptidi

Expressionssystem som utnyttjar autolyserande fusionsproteiner och ny reducerande polypeptid

Ilmentämisjärjestelmät, joissa käytetään hyväksi
autolysoivia fuusioproteiineja ja
uusi pelkistävä polypeptidi
Expressionssystem som använder sig av
5 autolyserande fusionsproteiner och
en ny reducerande polypeptid

10

Keksinnön ala

Tämä keksintö liittyy polypeptidin ilmentämisjärjestelmiin, jotka vaa-
tivat edeltäjätuotteen pilkkoutumisen, ja proteaaseihin käytettäväksi
15 tällaisissa järjestelmissä. Tämä keksintö liittyy lisäksi uuteen poly-
peptidiin, joka kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia ja hapettu-
nutta glutationia, DNA:han, joka koodaa uutta polypeptidiä, vektorei-
hin, jotka sisältävät tällaista DNA:ta, isäntiin, jotka on transformoi-
tu tällaisilla vektoreilla ja farmaseuttisiin koostumuksiin, jotka
20 sisältävät tätä polypeptidiä. Lisäksi tämä keksintö liittyy myös tämän
polypeptidin monoklonaalisiin vasta-aineisiin ja menetelmään polypep-
tidin eristämiseksi ja puhdistamiseksi käyttämällä tällaista vasta-
ainetta.

25 Tekniikan taso

Potyvirukset on ryhmä viruksia, joista jokaisella on yksisäikeinen
RNA-genomi, jossa on noin 10.000 emästä ja joka tartuttaa kasveja,
kuten Solanaceae-perhe. Potyvirus-genomille on tunnusomaista erittäin
30 pitkä avoin lukukehys tai ORF (= Open Reading Frame) [Dougherty, W.G.
and Hiebert, E. (1980), Virology 101: 466-474; Allison, R. et. al.
(1986), Virology 154: 9-20]. Yksittäisten ORF:ssä koodattujen protei-
nien ilmentämiseksi, luettu polyproteiini on merkitty kahdentyypisellä
proteaasilla, joista molemmat on koodattu ORF:ssä [Dougherty, W.G. ja
35 Carrington, J.C. (1988), Ann. Rev. Phytopath. 26: 23-1439.

Tobacco etch virus (TEV) kuuluu Potyvirusperheeseen ja tämä virus tuottaa tumainklusioita (nuclear inclusions), jotka voidaan värjätä trypaanisinisellä tarttuneissa soluissa. Tumainklusioiden muodostuvat ilmeisesti kahdenlaisesta proteiinista, joista toinen on osoittautunut olevan virusproteaaasi ja joka on merkitty Nuclear Inclusion a tai NIa [J. Virol., 61: 2540-2548 (1987)].

Potyvirusten NIa-proteaaasit tunnistavat ja halkaisevat peptidisekvenssin, joka sisältää jonkin seuraavista: Gln-Gly, Gln-Ser ja Gln-Ala ja uskotaan, että tämä sekvenssi on heksameerinen ja että se esiintyy kyseenomaisen NIa:n C-päänteessä polyproteiinissa. Halkaisu tapahtuu kahden jäännöksen välissä, joista edellä esitetyt dimeerit koostuvat.

TEV:n ja TVMV:n täydelliset genomiset sekvenssit (TVMV = Tobacco Vein Mottling Virus), joka TVMV on toinen Potyvirusperheen jäsen, on määritetty ja homologiatutkimus on löytänyt näiden virusten NIa:t niiden kyseenomaisissa genomeissa [Virology, 154: 9-20 (1986); Nucleic Acid Res., 14: 5417-5430 (1986)].

Clover Yellow Vein Virus tai CYVV on myös Potyvirus. Toistaiseksi ainoastaan geeni, joka esiintyy CYVV-genomin 3'-päänteessä yhdessä päällystysproteiinin kanssa, jota se koodaa, on sekvenssoitu [Uyeda, I. *et al* (1991), Interviol. 32: 234-245]. Genomin NIa-alueen rakennetta ei ole aikaisemmin määritetty eikä vastaavaa NIa:ta ole eristetty.

Ulkoisten proteiinien tuotanto ilmentämisjärjestelmillä voi olla suoraan etenevä käyttämällä alalla hyvin tunnettuja tekniikoita. On kuitenkin olemassa monia polypeptideja, joita ei helposti voida ilmentää ulkoisissa järjestelmissä. Ongelmana saattaa olla se, että polypeptidejä ei voida ilmentää suurissa määrissä ja tätä ei voida yleensä korjata ainoastaan sijoittamalla säätävä geeni ylävirtaan. Saattaa myös olla niin, että posttransskriptisia tapahtumia, jotka ovat välttämättömät täysikypsän muodon saamiseen, ei esiinny tai ne menevät vikaan.

Esimerkiksi monet eukaryoottiset polypeptidit luetaan ensin N-päämetioniinilla, joka sen jälkeen poistetaan täysikypsän muodon saamiseksi. Tämä käsittely ei voi tapahtua prokaryooteissa, joten vaihtoehtoisia keinoja ilmentämisen saamiseksi piti löytää. Eräässä sellaisessa tekniikassa haluttu ulkoinen proteiini yhdistetään maltoosia sitovaan proteiiniin tai glutationi-S-transferaasiin, esim. puhdistamalla ilmaistu fuusioproteiini ja sitten pilkkomalla proteaasilla, kuten Xa-tekijällä, enterokinaasilla tai trombiinilla. Tämän hankalan menetelmän päähaikkana on, että se vaatii kaksi puhdistusvaihetta, mikä johtaa päätuotteen oleelliseen menetykseen.

US-patentti nro 5,162,601 esittää TEV-proteaasin käytön polyproteiinin valmistuksessa, jossa on kytkentäsekvenssit jokaisen proteiinin välissä, jonka sen halutaan ilmentävän, kuten ihmisen tPA. Tämä patentti esittää kuitenkin ainoastaan sen multigeenin kloonauksen, joka koodaa tätä polyproteiinia isäntään. Ei esitetä mitään proteolyttisesti hal-
kaistun loputuotteen ilmentämisestä tai puhdistamisesta.

Happea aineenvaihduntaenergiaa varten saadaan yleensä hapetusaineiden muodossa solu ympäristössä. Aktivoitu muoto, jossa happea käytetään on yleisesti vapaa radikaali, kuten superoksidi (O_2^-), peroksidi (H_2O_2) tai hydroksiradikaali (OH^-), joista kaikki pelkistetään veden (H_2O) muodostamiseksi käytön jälkeen. Happikaasu on itsessään hyvin hapettavaa, mutta termiä "aktivoitu happi" käytetään tässä, sellaisesta hapestusta ja sellaisista happea sisältävistä molekyyleistä, joilla on vahvempi hapettava kyky kuin ilmakehän hapella. Aktivoidun hapen vahvin muoto on vapaa radikaali, joka on molekyyli tai atomi, jolla on yksi tai useampi pariton elektroni.

Vapaaradikaalit ovat tyypillisesti epästabiileja ja jos niitä ei sopivalla tavalla kontrolloida, ne voivat pilata lipidejä, proteiineja ja nukleiinihappoja. Siksi, vaikka aktivoitu happi on olennaista elämälle, se on myös mahdollinen terveysvaara ja sitä pitää kontrolloida hyvin tarkkaan. Jopa erittäin pienissä määrissä aktivoitu happi voi aiheuttaa sairauksia korkean reaktiivisuutensa takia. Tämän tuloksena elävät

organismit eivät jää henkiin, jos niillä ei ole puolustusmekanismeja aktivoitua happea vastaan.

- Soluympäristössä aktivoituneen hapen sijainnit, määrät ja tuottoajat on huolellisesti balansoitava solun kykyyn neutralisoida siihen liittyvä vaara. Tämä kyky saadaan tyypillisesti puolustusmekanismista, joka käyttää omia antioksidanttejaan tai antioksidointientsyymejään. Tämän keksinnön yhteydessä "antioksidantti" on yleinen nimi luonnollisesti esiintyvistä aineista, jotka kykenevät estämään tai inhiboimaan lipidien auto-oksidoinnin, esimerkiksi. Termiä "antioksidointientsyymi" käytetään yleisesti entsyymistä, joka katalysoi reaktion, joka eliminoi aktivoitua happea, jolloin termi "antioksidointivaikutus" rakennetaan tämän mukaisesti.
- Ylimääräistä aktivoitua happea muodostuu lukuisissa epänormaaleissa olosuhteissa kuten esim. kun henkilö on stressaantunut, käyttää huumeita, tupakoi, leikataan kirurgisesti, saa elinsiirännäisen tai jos hän kärsii iskemiasta, joka johtuu aivo- tai sydäninfarktista. Nämä suuret määrät ovat enemmän kuin mitä kehon kontrollijärjestelmät pystyvät eliminoimaan niin, että ylimäärä aktivoitua happea voi aiheuttaa lisää haittaa keholle ja vakavasti vaurioittaa normaaleja soluja. Tämän tuloksena tullut nk. hapettava stressi on vastuussa monista sairaus-tiloista.
- Esimerkiksi, kun kyseessä on arterioskleroosi, ominaispainoltaan matalaspesifisten lipoproteiinien läsnäoloa, joka on hapetettu aktivoituneella hapella, pidetään sairautta aiheuttavana [Steinberg, D. (1983), Arteriosclerosis 3, 283-301]. Hapettava stressi on myös havaittu läheisesti liittyvän sellaisten mekanismien syyhyn ja vaikutukseen, jotka liittyvät aineenvaihduntahäiriöihin sekä sokeritautiin liittyviin verenkiertohäiriöihin [Kondo, M. ed., "Approaches from Modern Medicine (4) Free Radicals", Medical View Pub., pp. 138-146].
- Aktivoitu happi liittyy myös muihin patologisiin tiloihin kuten:
- iskeemiset taudit (reperfuusiotaudit, iskeeminen sydäntauti, aivo-

iskeemia, iskeeminen enteriitti ja vastaavat), turvotus, verisuonten liikaläpäisevyys, tulehdus, mahan limakalvon taudit, akuutti haimatulehdus, Crohnin tauti, vatsahaava, maksataudit, Paraquatin tauti, keuhkoilmapöhö, kemiallisista aineista johtuva syöpä, pahanlaatuinen etäis-
 5 pesäke, aikuisen hengityshäiriösyndrooma, hajasirotteinen verisuonten sisäinen koagulointi (DIC), kaihi, keskosten verkkokalvosairaus, autoimmuuniset taudit, porfyriini-verisyys, hemolyyttiset taudit, Välimeren anemia, Parkinsonin tauti, Alzheimerin tauti, epilepsia, ultraviolettisäteilystä johtuvat taudit, radioaktiivisesta säteilystä johtuvat tau-
 10 dit, paleltumat ja palovammat.

Useita puolustusmekanismeja on sekä solujen sisäpuolella että ulkopuo-
 lella pelkästään siihen tarkoitukseen, että eliminoidaan fysiologisesti
 tuotettua aktivoitua happea.

15

Solun sisäisten antioksidanttien ja antioksidatiivisten entsyymien
 kuten niiden, jotka on annettu seuraavassa, tiedetään käsittelevän ja
 eliminoivan aktivoitua happea. Esimerkiksi katalaasia esiintyy peroksi-
 someissa ja tämä entsyymi pelkistää ja poistaa vetyperoksidia. Gluta-
 20 tioniperoksidaasia on sytoplasmassa ja mitokondreissa ja tämä entsyymi
 pelkistää ja poistaa myrkyllisyyden vetyperoksidista ja lipidiperoksi-
 deista pelkistetyn glutathionin läsnäollessa. Transferiini, ferritiini
 ja laktoferriini esimerkiksi inhiboivat aktiivisen hapen tuottoa stabi-
 loimalla rautaioneja, kun taas seruloplasmiinilla on samanlainen funk-
 25 tio kupari-ionien yhteydessä. Lisäksi superoksidi-dismutaasi, jota on
 läsnä sytoplasmassa ja mitokondreissa, katalysoi superoksidien pelkis-
 tämisen vetyperoksidin muodostamiseksi, jolloin vetyperoksidia silloin
 eliminoituu esim. katalaasin vaikutuksesta. Lisäksi, C- ja E-vita-
 miinit, pelkistetty glutathioni ja muut matalamolekyyliset yhdisteet
 30 kykenevät myös pelkistämään ja eliminoimaan aktiivista happea.

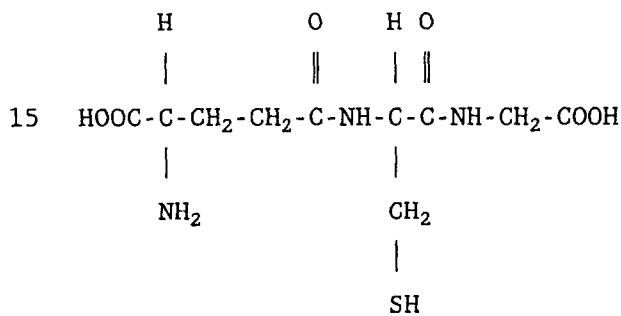
Toisaalta tällaiset aineet kuten solun ulkopuolinen superoksidi-dismu-
 taasi, solun ulkopuolinen glutathioni-peroksidaasi ja pelkistetty gluta-
 thioni on solun ulkopuolisessa ympäristössä ja niillä on samanlaisia
 35 vaikutusmalleja kuin edellä luetelluilla solun sisäisillä vastaavilla

aineilla. Verrattuna solun sisäiseen tilanteeseen solun ulkopuolisia antioksidantteja ja antioksidatiiveja entsyymejä on kuitenkin vähemmän erityyppisiä ja ainoastaan pieni osa niistä saa aikaiseksi solun ulkopuolista antioksidatiivista vaikutusta.

5

Pelkistetyllä glutationilla on tärkeä vaikutus siinä, että se ylläpitää pelkistetyn tilan solujen sekä sisä- että ulkopuolella ja se esitetään seuraavalla kaavalla. Glutationin keksi ensin hiivassa de-Rey-Pailhade v. 1888 ja myöhemmin se nimettiin glutationiksi sen jälkeen kun Hopkins

10 eristi sen yhdisteenä v. 1921.



20

Glutationi muodostuu kolmesta aminohaposta: glutamiinihaposta, kysteiinistä ja glysiinistä. Kahden glutationimolekyylin tioliryhmät voidaan hapettaa disulfididisidoksen muodostamiseksi aktivoituneen hapen läsnäollessa, siten pelkistäen aktivoituneen hapen.

25

Glutationia muodostuu pääasiassa maksassa ja se kiertää kehossa plasman kautta. Normaalissa kehossa glutationi on lähes kokonaan pelkistetyssä muodossa. Kun hapetetun muodon määrät suurenevat, silloin glutationi-

30 reduktaasin vaikutus regeneroi pelkistettyä muotoa nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidi-fosfaatin läsnäollessa (NADPH). Siten pelkistetty glutationi suojaa solun membraania hapettavilta taudeilta ja toimii pelkistämällä aktivoitua happea ja vapaaradikaaleja. Tämän antioksidatiivisen ominaisuuden tuloksena pelkistetty glutationi suojaa myös

35 radioaktiivisuuden vaikutuksilta ja on käyttökelpoinen terapeuttisena

lääkkeenä kaihia vastaan. On myös äskettäin raportoitu, että pelkistetyn glutathionin systeemiset arvot pelkistyvät AIDS-potilaissa, mikä yleensä on merkki siitä, että pelkistetyn glutathionin merkitys kehossa on erittäin tärkeä. Epänormaaleissa tiloissa aktivoituneen hapen määrä voi

5 kuitenkin olla niin suuri, että käytännöllisesti katsoen kaikki glutathioni on hapetetussa tilassa niin, että aktivoitu happi ei poistu niin nopeasti kuin mahdollista.

Ihmisen tioredoksiini on toinen esimerkki aineesta, jolla on erilaisia

10 fysiologisia vaikutuksia sen pelkistävän vaikutuksen takia sekä solujen sisä- että ulkopuolella. Ihmisen tioredoksiini (tunnettu myös ihmisen T-solu-leukemiasta johdettuna tekijänä ADF) kloonattiin tekijänä, joka kykeni saamaan aikaan interleukiini 2 reseptoreita (IL-2R) aikuisen T-solu-leukemian solulinjoissa. Se on tiolista riippuvainen reduktasi,

15 jossa on kaksi kysteiinijäännöstä aktiivisessa paikassa ja se kykenee pelkistämään aktivoitua happea ja vapaita radikaaleja.

IL-2 reseptorien sisällyttämisen lisäksi ihmisen tioredoksiini myös edesauttaa solun kasvua B-solukannassa 3B6, joka on Epstein-Barr-

20 viruksen (EBV) tartuttama; suojaa kasvaimen kuoliotekijää (TNF = tumor necrosis factor) vastaan, joka on johdettu monosyytti-alkuperäisestä solulinjasta U937; ja suojaa neutrofiilien huonontamia verisuonten endotelisoluja vastaan. Lisäksi solun sisäisessä ympäristössä ihmisen tioredoksiini vaikuttaa transkriptiotekijöihin NFkB, JUN ja FOS

25 pelkistävän vaikutuksensa ansiosta siten edesauttaen DNA:ta sitovaa vaikutusta ja mahdollistaen sen vaikutusta transkriptiovaikutuksen lisäämiseksi. Ihmisen tioredoksiinia kehitetään tällä hetkellä suoja-aineeksi radioaktiivisuussairauksia vastaan, kuten myös terapeuttiseksi

30 lääkkeeksi reperfuusiotauteja varten, reuman tapaista niveltulehdistusta ja tulehduksia vastaan, joita kaikkia tauteja vastaan voidaan suojautua, koska sillä on kyky suojella solun huonontumista vastaan sen pelkistävän vaikutuksen ansiosta.

Kuten edellä on kuvattu, on fysiologisesti erittäin tärkeää ylläpitää

35 sekä solun sisäiset että ulkopuoliset ympäristöt pelkistetyssä tilassa

eliminoimalla aktivoitua happea ja vapaita radikaaleja. Uskotaan, että on monia vielä tuntemattomia antioksidantteja ja antioksidatiiveja entsyymejä sekä solun sisä- että ulkopuolella, joilla on merkitystä aktivoidun hapen ja vapaan radikaalin poistamisessa. Olisi siksi erittäin käyttökelpoista
 5 löytää pelkistävä aine, joka kykenee regeneroimaan esim. pelkistettyä glutathionia. Tällaisesta aineesta olisi apua epänormaaliin kehon tilojen hoidossa kuten sellaisten, joita edellä on kuvattu.

Keksinnön yhteenveto

10

Tämän keksinnön ensimmäisenä kohteena on saada aikaan uusi proteaasi, nukleotidisekvenssi, joka koodaa tätä proteaasia, vektori, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa tätä proteaasia ja isäntäsolu, joka on transformoitu mainitulla vektorilla.

15

Tämän keksinnön toisena kohteena on saada aikaan DNA, joka koodaa mielenkiinnon kohteena olevaa proteiinia ja myös koodaa uutta proteaasia ylävirtaan mainitusta proteiinista, sekvenssi kahden mainitun sekvenssin välillä, joka vielä koodaa peptidiä, joka voidaan halkaista mainitulla proteaasilla, jolloin kaikki nämä sekvenssit ovat samassa avoimessa lukukehyksessä. Kohteena on myös saada proteiini, jota mainittu DNA koodaa, kuten myös vektori, joka sisältää mainittua DNA:ta ja ilmentämisjärjestelmä, joka käsittää mainitun vektorin, jolloin mainittu vektori kykenee replikoitumaan autonomisesti sopivassa isäntäsolussa,
 20 kuten käsittämällä nukleotidisekvenssin, joka vaaditaan autonomiseen replikointiin.

Vaihtoehtoisesti tämän keksinnön ensimmäisenä kohteena on saada nukleotidisekvenssi, joka koodaa uutta polypeptidiä, jolla on pelkistävää vaikutusta in vivo. Kohteena on myös saada sellainen DNA, joka koodaa peptidiä, joka kykenee pelkistämään diloori-indofenolia ja hapetettua glutathionia.
 30

Tämän keksinnön lisäkohteena on saada rekombinanttivektori, joka käsittää edellä mainittua DNA:ta, jolloin mainittu vektori kykenee toistu-
 35

maan autonomisesti sopivassa isäntäsolussa kuten sillä tavalla, että sillä on emäsekvenssi, joka mahdollistaa autonomisen replikoinnin.

Lisäksi tämän keksinnön lisäkohteena on saada isäntäsolu-mikro-

- 5 organismi, joka on transformoitu edellä mainitulla rekombinanttivektorilla. Kohteena on myös saada edellämainittu peptidi ilmentämistuotteena transformoidusta isäntäsolusta ja saada monoklonaalinen vasta-aine peptidiä vastaan.

- 10 Olemme nyt tunnistaneeet ja kloonanneet uuden CYVV-proteaaasin (N1a) ja olemme yllättäen havainneet, että on mahdollista käyttää CYVV N1a:ta osana fuusioproteiinia, joka voidaan ilmaista sellaisissa isännissä kuten E. coli ja joka sallii fuusioproteiinin suurien määrien tuottamisen, joka voi itsehalkaistua halutun ulkoisen proteiinin saamiseksi.
- 15 CYVV N1a -geeni voidaan stabiilisti ylläpitää ja ilmaista Escherichia colissa ja ilmaistut N1a:t ylläpitävät aktiivisuutensa erityisenä proteaasina myös silloin, kun proteiini muodostaa osan fuusioproteiinista.

- 20 Olemme myös löytäneet DNA:ta, joka koodaa uutta polypeptidiä, joka kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia (myös tunnettu dikloori-fenoli-indofenolina, 2,6-dikloori-indofenolina tai 2,6-dikloori-4-[(4-hydroksifenyyl)imino]-2,5-sykloheksadien-1-onina) ja hapetettua glutathionia, jolloin mainittu polypeptidi voidaan saada suurissa mää-
- 25 rissä käyttämällä sopivaa geenitekniikkaa. Tämä polypeptidi on erityisen käyttökelpoinen sellaisten tilojen hoidossa, joita aiheuttaa tai jotka liittyvät hapettavaan stressiin tai mihin vaan sairauteen, jonka aktivoitu happi aiheuttaa kuten arterioskleroosi, diabetes ja iskeemiset taudit (mukaanlukien reperfuusiotaudit, iskeemiset sydäntaudit,
- 30 aivoiskeemia ja iskeeminen enteriitti.

Siten tämän keksinnön ensimmäisen suoritusmuodon mukaisesti saadaan polynukleotidisekvenssi, jossa mainittu sekvenssi käsittää, 5'-3'-suunnassa ja samassa avoimessa lukukehyksessä:

- a) sekvenssin, joka koodaa clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a -proteiinia tai sen mutanttia tai muunnelmaa, jolla on samanlainen proteolyttinen spesifisyys kuin clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a -proteiinilla;
- 5 b) sekvenssin, joka koodaa peptidiä, jonka mainittu clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a -proteiini tai sen mutantti tai muunnelma voi tunnistaa ja halkaista;
- 10 c) ainakin yhden sekvenssin, joka koodaa polypeptidiä.

Esillä olevalla keksinnöllä saadaan myös sekvenssi, joka koodaa clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a -proteiinia tai sen mutanttia tai muunnelmaa, jolla on samanlainen proteolyttinen spesifisyys kuin

15 clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a -proteiinilla.

Tällä keksinnöllä saadaan myös vektori, varsinkin ilmentämisvektori, joka sisältää edellä mainitun sekvenssin.

20 Tällä keksinnöllä saadaan vielä lisäksi isäntä, joka on transformoitu edellä mainitulla vektorilla kuten myös ilmentämisjärjestelmä, joka käsittää mainitun isännän ja mainitun ilmentämisvektorin ja myös polypeptidi, jota tällainen ilmentämisjärjestelmä tuottaa.

25 Keksinnön vaihtoehtoisessa suoritusmuodossa saadaan ensimmäisen suoritusmuodon mukaisesti polynukleotidisekvenssi, joka koodaa polypeptidiä, jossa on aminohapposekvenssi, jossa on ID-sekvenssin 12 aminohapot 1-526 tai joka koodaa mainitun polypeptidin mutanttia tai muunnelmaa sillä edellytyksellä, että polypeptidi, jota nukleotidisekvenssi koo-

30 daa, kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia ja hapetettua glutatio-

nia.

Saadaan myös vektori, varsinkin ilmentämisvektori, joka sisältää sekvenssin, joka on määritelty edellä.

Tällä keksinnöllä saadaan vielä isäntä, joka on transformoitu edellä mainitulla vektorilla, kuten myös ilmentämisjärjestelmä, joka käsittää mainitun isännän ja mainitun ilmentämisvektorin ja myös polypeptidi, jota ilmentämisjärjestelmä tuottaa.

5

Keksinnöllä saadaan myös edellä oleva polypeptidi käytettäväksi terapiassa, kuten myös sellaisen polypeptidin käyttö sairaustilojen hoidossa ja ennalta ehkäisyssä, jota aiheuttaa tai jotka liittyvät hapettuvaan stressiin, tai johonkin sairauteen, jota aktivoitu happi aiheuttaa, ja farmaseuttiset koostumukset, jotka käsittävät tätä polypeptidiä.

Saadaan vielä vasta-aine, varsinkin monoklonaalinen vasta-aine, ja sen ekvivalentit polypeptidiä vastaan ja keksinnöllä saadaan vielä lisäksi menetelmä tällaisen vasta-aineen valmistamiseksi ja menetelmä polypeptidin puhdistamiseksi, jossa käytetään vasta-ainetta.

Piirustusten lyhyt kuvaus

20 Tätä keksintöä kuvataan piirustuksiin nähden, joissa:

Kuvio 1 on CYVV-cDNA:sta eristetyn NIa-alueen cDNA:n restriktioentsyymikartta;

25 Kuvio 2 on pKNI5'-plasmidin rakenne, joka sisältää NIa:n 5'-alueen;

Kuvio 3 esittää pKNI5IL-plasmidin rakenteen, joka sisältää osan IL-111-geenistä ja NIa:n 5'-alueen;

30 Kuvio 4 näyttää primeereitä, joita käytettiin 5'IL-DNA-fragmentin valmistamiseksi ja jossa NIa-geenin 3'-pääte ja IL-11-geenin 5'-pääte on yhdistetty;

Kuvio 5 esittää CIN3-DNA-fragmentin ja IL5'DNA-fragmentin fuusion
35 PCR:llä;

Kuvio 6 esittää pKSUN9-plasmidin rakenteen;

Kuvio 7 on pUCKM31-7-restriktioentsyymikartta;

- 5 Kuvio 8 on pUCKM31-7:n ja pcD-31:n 3'-päätteiden nukleotidisekvenssien vertailudiagrammi;

Kuvio 9 on pSR α 31-7:n rakennediagrammi;

- 10 Kuvio 10 on diagrammi histidiiniheksameeriä koodaavan sekvenssin sisällyttämisestä pUCKM31-7:ään;

Kuvio 11 on pMAL31-7:n rakennediagrammi;

- 15 Kuvio 12 on dikloorifenoli-indofenolia pelkistävän vaikutuksen analyysidiagrammi; ja

Kuvio 13 on hapetetun glutationia pelkistävän vaikutuksen määrittäminen.

- 20 Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tätä keksintöä kuvataan ensin viittaamalla tämän keksinnön ensimmäiseen suoritukseenmuotoon, mutta seuraava keskustelu sopii myös keksinnön toiseen suoritukseenmuotoon, jos ei ole selvää, että keskustelu ei sovellu toiseen suoritukseenmuotoon.

- 25 Huomautetaan, että on edullista keksinnön mukaiselle polynukleotidisekvenssille yleisesti ottaen, että se on DNA:n muodossa ja kun siihen viitataan tässä, se on tästä syystä yleisesti DNA. Kuitenkin näihin viittauksiin sisältyy myös RNA, kun niin sopii. RNA ei ole niin edullinen, koska sen käyttöä rajoittaa käytännölliset syyt. Esim. mRNA:ta voidaan ilmentää xenopus-varhaismunasoluissa tai vehnän itujen lysaattijärjestelmissä, mutta kumpikaan näistä ei ole käytännöllinen fuusio-
- 30 proteiinin suurten määrien tuottamiseen talaudellisesti.

Tässä käytettynä termi "peptidi" tarkoittaa mitä vain molekyyliä, joka käsittää 2 tai useampia aminohappoja, jotka on liitetty peptidisidoksella. Sellaisenaan termiin kuuluvat oligopeptidit, polypeptidit ja proteiinit. Termi "fuusioproteiini" liittyy mihin vain yksittäiseen
 5 polypeptidiin, joka on saatu yhdistämällä kaksi tai useampi muu peptidisekvenssi.

Huomautetaan myös, että keksinnön mukainen sekvenssi on edullinen kaksisäikeisenä ja että esillä olevaan keksintöön myös kuuluu antisense-
 10 sekvenssi, joka vastaa keksinnön mukaista sekvenssiä. Keksinnön mukaisessa kaksisäikeisessä (tai ds) sekvenssissä on tai ei ole yksi tai kaksi "tarttuvaa" päätä, jossa tapauksessa antisense- ja sense-säikeiden ei välttämättä tarvitse tarkkaan vastata toisiaan.

15 Proteiini, jota sekvenssi koodaa, joka on tunnistettu edellä kohdassa a), on tarkoitettu halkaisemaan peptidi, jota koodaa edellä oleva sekvenssi b) polypeptidin tai polypeptidien vapauttamiseksi, joita koodaa sekvenssi kohdassa c) edellä, kun keksinnön mukainen sekvenssi ilmaistaan sopivalla ilmentämisjärjestelmällä.

20

Fuusioproteiinin halkaiseminen voi tapahtua koska vain sen jälkeen, kun edellä olevat kohtien a) ja b) sekvenssit on luettu. Sellaisenaan huomataan, että polypeptidiä, jota koodaa kohta c) edellä, ei tarvitse täysin lukea ennen halkaisua. Käytännössä kuitenkin olemme havainneet,
 25 että ainakin osa fuusioproteiinista, vaikkakaan ei pääosa, on täysin luettu ennen halkaisua.

Kun edellä oleva sekvenssi c) koodaa useampaa kuin yhtä polypeptidiä, on välttämätöntä koodata enemmän halkaisusekvenssejä jokaisen koodatun
 30 polypeptidin välillä, jos ei esim. toivota, että saadaan halkaisematon polypeptidien fuusiomoninaisuus.

Jos edellä oleva sekvenssi c) koodaa enemmän kuin yhtä polypeptidiä, silloin sekvenssille voidaan tehdä transkriptioympäristö. Heikentyneessä prosessissa keksinnön mukaisen mRNA-sekvenssin transkriptio pysähtyy
 35

ennen kuin koko mRNA:ta on luettu niin, että polypeptidejä, joita on koodattu lähempänä sekvenssin 3'-päättä tuotetaan pienemmässä määrässä kuin niitä, joita on koodattu lähempänä 5'-päättä. Heikentyminen ei yleisesti ottaen ole ongelma paitsi silloin, kun useita polypeptidejä
 5 koodataan ja/tai polypeptidit ovat hyvin pitkiä.

Yleensä on myös edullista, että edellä oleva sekvenssi c) koodaa ainoastaan yhtä polypeptidiä, jos ei haluta valmistaa useita peptidejä käytettäväksi yhdessä tai kun nämä useat polypeptidit ovat sulautuneet
 10 yhteen. Muuten on välttämätöntä eristää yksittäiset polypeptidit halkaisun jälkeen ja tämä voi olla haitallista ja tuhjata lopputuotetta puhdistusmenetelmillä.

Kun kuitenkin edellä oleva sekvenssi c) koodaa useampaa kuin yhtä polypeptidiä ja on halkaisusekvenssi jokaisen koodatun polypeptidin välillä, silloin halkaisusekvenssejä ei välttämättä tarvitse tunnistaa
 15 CYVV-NIa:lla. Kaikki, mikä on välttämätöntä halkaisusekvenssille sekvenssin a) ja sekvenssin b) 5'-päädyn välillä on, että ne tunnistetaan proteaasilla, jota sekvenssi a) koodaa. Kun halutaan tai on hyväksyttävää sallia, että fuusioproteiini itseliukenee useiden polypeptidien valmistamiseksi, silloin mikä vain lisähalkaisusekvenssi voidaan tunnistaa proteaasilla, jota kohdan a) sekvenssi koodaa. Sellaiset sekvenssit voidaan kuitenkin valita niin, että ne voidaan halkaista muilla tavoilla niin, että fuusioproteiini halkaistaan sen NIa-osalla trans-
 20 kription jälkeen NIa:n ja polyproteiinin saamiseksi. NIa voidaan sitten poistaa ja polyproteiini voidaan halkaista Xa-tekijällä tai trypsiinillä.

Edellä olevan sekvenssin b) koodaama halkaisupeptidi (siihen viitataan
 30 myös nimellä "halkaisusekvenssi" ja "halkaisupeptidi") voi olla sekvenssi, joka kokonaan tai osittain käsittää jomman kumman sekvensseistä, joita sekvenssit a) ja c) koodaa ("NIa" tai "proteaasi" ja "polypeptidi"). Siten halkaisupeptidin N-pääte voidaan myös sisällyttää proteaasin C-pääte sekvenssiin, kun taas halkaisupeptidin C-pääteosa
 35 voidaan sisällyttää polypeptidin N-pääteosaan. Silloin halkaisupepti-

dillä ei ole mitään itsenäistä olemassaoloa ja proteaasin tunnistuspaikka tehdään proteaasin C-pääteestä ja polypeptidin N-pääteestä.

Halkaisupeptidi voidaan myös sisällyttää ainoastaan osaan proteaasia tai polypeptidiä. Jos näin on, halkaisupeptidin N-pääte normaalisti sisällytetään proteaasin C-pääteosaan ja polypeptidin N-pääteosa liitetään joko suoraan halkaisusekvenssiin tai polypeptidin ja liittäineen välillä on yksi tai useampi aminohappojäännös.

10 Kun on yksi tai useampi aminohappojäännös halkaisusekvenssin ja proteaasin ja/tai halkaisusekvenssin ja polypeptidin välillä, silloin tällaisten jäännösten lukumäärän ja laadun olisi oltava sellaisia, että ne eivät estä proteaasin vaikutusta. Ylimäärä aminohappojäännöksiä polypeptidin N-päätteessä ei yleensä ole edullista silloin, kun nämä jäännökset on poistettava polypeptidin täyskypsän muodon saamiseksi.

15 On yleensä edullista, silloin kun se on mahdollista ja kun muuta ei sanota, käsitellä halkaisupeptidiä niin, että saadaan halutun proteiinin täyskypsä muoto halkaisemalla fuusioproteiini. On kuitenkin täysin mahdollista saada proteiini, jossa on Gly, Ser tai Ala liittyneenä
20 N-päätteeseen, esimerkiksi, ja nämä voidaan poistaa sopivan aminopeptidaasin vaikutuksesta, jos halutaan.

Joskus on toivottavaa koodata proliinia halkaisusekvenssin ja polypeptidin N-päätteen välillä. Tällöin jäännöksiä voidaan halkaista proliinijäännökseen asti aminopeptidaasin P vaikutuksella (3.4.11.9) esimerkiksi, mutta ei sen yli. Sen sijaan proliinijäännös voidaan sitten poistaa proliini-iminopeptidaasin vaikutuksesta täyskypsän proteiinin saamiseksi. Tämä muodostaa keksinnön edullisen suoritusmuodon.

30 Sekvenssi a) koodaa proteaasia, joka kykenee halkaisemaan fuusioproteiinin, jota keksinnön mukainen sekvenssi koodaa. Tässä keksinnössä tämä proteaasi on clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a -proteaa-
si tai sen mutantti tai muunnelma, jolla on samanlainen proteolyyttinen spesifisyys kuin clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a
35 -proteasilla.

Clover yellow vein -viruksen NIa-proteaasi koodataan nukleotidinumeroilla 10-1311 sekvenssissä ID nro 1 sekvenssilistauksessa, kun taas NIa:n primäärisekvenssi annetaan aminohapponumeroilla 4-437 sekvenssilistauksen sekvenssissä ID nro 2. Nämä sekvenssit ovat uusia ja muo-

5 dostavat osan tästä keksinnöstä, kuten myös niiden mutantit ja muunnelmät.

Nuclear Inclusion a:lla on proteolyttistä aktiivisuutta, joka erityisesti hydrolysoi peptidisidoksen seuraavien parien välillä: Gln-Ala,

10 Gln-Gly tai Gln-Ser substraattipeptidissä. Lisäksi olemme myös havainneet, että NIa voi halkaista parin Gln-Val. Siten päinvastoin kuin muissa Potyvirus-perheen proteaaseissa olemme havainneet, että CYVV-NIa (viittaukset NIa:han tässä pitäisi ymmärtää niin, että ne tarkoittavat CYVV-NIa, jos ei muuta sanota) voi halkaista sekvenssin

15 AsnCysSerPheGlnX, jossa X on mikä vain aminohappojäännös, mutta varsinkin Gly, Ala, Val tai Ser, ja varsinkin Gly, Ala tai Ser.

Huomataan myös, että peptidit, jotka käsittävät sekvenssin AsnCysSerPheGlnX, voidaan halkaista NIa:lla, varsinkin kun sellainen sekvenssi

20 altistetaan steerisesti NIa:n vaikutukselle. Siten esillä olevalla keksinnöllä saadaan myös järjestelmä polypeptidin valmistamiseksi, jossa polypeptidin edeltäjä, joka sisältää sekvenssin AsnCysSerPheGlnX, halkaistaan NIa:lla. Tämä järjestelmä voi myös käsitellä lyvaihteita, sopivasti, joko ennen tai jälkeen NIa:lla tapahtuvaa halkaisua.

25

Vaikka yleensä pidämme edullisena käyttää sekvenssiä, joka koodaa luonnollisesti esiintyvää NIa:ta (sekvenssi ID 2:n mukaisesti), tässä keksinnössä käytetään yhtä hyvin NIa:n mutantteja tai muunnelmia.

30 Kuten on esitetty, proteaasilla pitäisi olla sama tai samanlainen spesifisyys kuin luonnollisesti esiintyvällä NIa:lla. Tässä suhteessa proteaasilla pitäisi yleisesti ottaen olla olennainen sekvenssihomologia aminohappojäännösten 4-437 kanssa sekvenssissä ID 2 paitsi, että

35 alan ammattihenkilölle on ilmiselvää, että olennainen muunnelma on mah-

dollinen muuttamatta tunnistussekvenssiä tai pelkistävää aktiivisuutta käyttökelpoisten arvojen alapuolelle.

Yleisesti ottaen on niin, että minkä vaan annetun proteiinin aktiivisuus riippuu molekyylin tietyistä säilyneistä alueista, kun taas muilla alueilla on vain vähäinen merkitys niiden erityiseen sekvenssiin ja jotka käytännöllisesti katsoen voivat olla täysin erilaisia. Siksi, kuten edellä on esitetty, tähän keksintöön kuuluvat variantit ja mutantit sekvenssissä, joilla yhä on samanlainen spesifisyys siihen kuin luonnollisesti esiintyvällä NIa:lla. Näihin muunnelmiin ja mutantteihin kuuluvat esim. poistot, lisäykset, insertit, inversiot, toistot ja tyyppisubstituoinnit (esim. yksi hydrofiilinen jäännös korvataan toisella, mutta vahvasti hydrofiilistä osaa ei säännönmukaisesti korvata vahvasti hydrofobisella osalla). Pienillä muutoksilla on yleisesti ottaen vain pieni vaikutus aktiivisuuteen, jos ne eivät ole molekyylin olennaisessa osassa ja sellaiset muutokset voivat olla geenimanipuloinnin sivutuotetta, esim. kun tuotetaan ylimääräisiä restriktiopaikkoja, jos sellaista halutaan.

Yleensä ei ole mitään erityistä syytä muuttaa NIa:n rakennetta paitsi olosuhteissa, jotka ovat selviä alan ammattihenkilöille. Tosiaan useimmat mutaatiot ja variaatiot joko aminohapossa tai koodaavassa sekvenssissä on uusien variaatioiden eristämisen syytä alkuperäisessä villintyyppisessä viruksessa. Siitä huolimatta vapauttavia ja myös vahingossa tapahtuvia modifikaatioita ei voida poissulkea esillä olevasta keksinnöstä sillä edellytyksellä, että proteaasilla on välttämätön spesifisyys ja riittävä proteolyttinen vaikutus.

Tässä käytettynä termi "haitallinen vaikutus" tarkoittaa mitä vain vaikutusta spesifisyyteen tai aktiivisuuteen, mikä tekee proteaasin merkittävästi tehottomammaksi kuin luonnollisesti esiintyvä NIa, joka on tunnistettu edellä siinä määrin, että aktiivisuus vähenee alle käyttökelpoisen tason.

Monia substituoitunteja, lisäyksiä ja vastaavia voidaan suorittaa ja ainoa rajoitus on se, että se ei saa haitallisesti vaikuttaa aktiivisuuteen. Yleisesti ottaen haitallinen vaikutus aktiivisuuteen on ainoastaan todennäköistä, jos 3-D (tertiäärinen) rakenne N1a:ssa vaurioituu vakavasti.

Termiä "mutantit" käytetään tässä poistoista, lisäyksistä, inserteistä, inversioista ja aminohappojäännöksen korvaamisesta sekvenssissä, joka ei haitallisesti vaikuta aktiivisuuteen. Esillä olevaan keksintöön kuuluu lisäksi "muunnelmat", jolloin tätä termiä käytetään luonnollisesti esiintyvän CYVV N1a:n yhteydessä, joka läheisesti vastaa sekvenssiä ID 2, mutta joka poikkeaa siitä tavalla, jota voidaan odottaa suuressa populoinnissa. Tähän määritelmään kuuluu alleeli-variaatio ja ne peptidit muista viljelmistä, joissa on samantyyppistä aktiivisuutta ja joissa on siihen liittynyt sekvenssi.

Huomataan, ettei N1a:n eikä esillä olevan keksinnön toisen suoritustavon proteiinin tarvitse täysin vastata sekvenssejä ID 2 ja ID 12. Ainoa vaatimus on se, että kummallakin on haluttu vaikutus, jos polypeptidi on ainoastaan fraktio koko luonnollisessa sekvenssissä tai jopa sellaisen fraktion mutantti tai variantti.

Eukaryoottien geenien, kuten interferonigeenin, sanotaan yleisesti olevan polymorfismisia [c.f., Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem. 97, 153-159]. Tämä polymorfismi on tuloksena joissakin tapauksissa, kun yksi tai useampi aminohappo korvataan polypeptidissä kuten myös muissa tapauksissa, joissa ei ole mitään muutoksia aminohapposekvenssissä, paitsi nukleotidin substituoitio.

Siten huomataan, että polynukleotidia koodaavaa sekvenssiä voidaan myös modifioida halutulla tavalla sillä edellytyksellä, että sillä ei ole haitallista vaikutusta proteaasin aktiivisuuteen. Mielivaltaiset mutaatiot ja muut muutokset voidaan suorittaa lisäämällä tai poistamalla

restriktiopaikkoja, esim. jos muulla tavalla halutaan auttaa geenimaniipulaatiota/ilmentämistä tai muuten tavanomaisesti parantaa NIA-molekyylin modifiointia.

- 5 Termejä "mutantti" ja "variantti" käytetään myös tässä, kun viitataan polynukleotidisekvenssiin, ja tällaiset viitteet pitäisi tehdä sopival-
la tavalla, mutatis mutandis. On huomattava, että vaikka peptidisek-
venssin mutantti tai variantti aina heijastuu koodaavaan nukleotidisek-
venssiin, päinvastainen ei aina päde. Siksi saattaa olla mahdollista,
10 että nukleotidisekvenssi muuttuu olennaisesti (kts. keskustelu alla
olevan geneettisen koodin degeneraatiosta), vaikuttamatta peptidisek-
venssiin millään tavalla. Sellaiset nukleotidisekvenssin mutantit ja
variantit ovat keksinnön piirissä.
- 15 On esim. saatu selville, että proteiini, joka saadaan korvaamalla sys-
teemikodoni interleukiini 2 (IL-2) geenissä seriinikodonilla, vielä
kykenee ilmaisemaan IL-2 aktiivisuutta [Wang. A etal. (1984), Science
224: 1431-1433]. Siksi niin kauan kuin sekvenssi koodaa luonnollisesti
esiintyvää tai synteettistä proteiinia, jolla on sopiva NIA-vaikutus,
20 se on tämän keksinnön sisällä.

Geeniä, joka koodaa keksinnön mukaista NIA:ta, voi alan ammattihenkilö
helposti käänteiskäsitellä sekvenssistä ID-2.

- 25 On huomattava, että mikä vain annettu käänteiskäsitelty sekvenssi ei
välttämättä hybridisoidu hyvin tai ollenkaan millä vain annetulla täy-
dentävällä sekvenssillä, joka on käänteiskäsitelty samasta peptidistä
geneettisen koodin degeneraatiosta johtuen. Tämä on tavallinen tekijä
alan ammattihenkilön arvioinneissa ja minkä vain annetun sekvenssin
30 degeneraatio on usein niin laaja, että on erittäin vaikeata syntetisoi-
da jopa lyhyt täydentävä oligonukleotidisekvenssi, jotta se toimisi
koettimena luonnollisesti esiintyvälle oligonukleotidisekvenssille.

- Koodin degeneraatio on sellainen, että siinä voi olla neljä tai useam-
35 pia mahdollisia kodoneita useimmin esiintyville aminohapoille. Siksi

voidaan nähdä, että mahdollisten koodaavien sekvenssien lukumäärä mille vain annetulle peptidille voi lisääntyä eksponentiaalisesti jäännösten lukumäärällä. Sellaisenaan on huomattava, että keksinnön mukaisen Nla:n mahdollisten koodaavien sekvenssien lukumäärällä voi olla kuusi tai usempia kuvioita. Voi kuitenkin myös olla toivottavaa tasapainottaa siihen liittyvän ilmentämisjärjestelmän mukainen G + C sisältö, ja muita tekijöitä kuten myös koodifrekvenssi asianmukaiselle ilmentämisjärjestelmälle olisi yleisesti ottaen otettava huomioon.

- 10 Kuten edellä on esitetty, hybridisointi voi olla epäluotettava sekvenssihomologian indikaatio, mutta siitä huolimatta sekvenssit, joissa on enemmän kuin 50 %:n, edullisesti 70 %:n, ja edullisimmin 80 %:n homologia sekvenssin ID-1 kanssa, ovat yleisesti ottaen edullisia. Joka tapauksessa olisi huomattava, että proteaasi, joka on määriteltä, pitäisi olla koodattuna.

Tällä keksinnöllä saadaan myös proteaasin ylävirrassa koodatun johtosekvenssin mahdollinen käyttö. Täten voitaisiin esim. saada fuusioproteiini ulkopuoliseksi isännästä ja kerätä kelluvaan osuuteen. Tuloksena saadun ulosotetun fuusioproteiinin voitaisiin sitten antaa liueta itse ja kerätä polypeptidi. Sellaisia signaalsekvenssejä varten voidaan käyttää mitä vain sopivaa sekvenssiä, varsinkin kun sellainen on erityisesti kehitetty tiettyä ilmentämisjärjestelmää varten.

- 25 Esillä olevalla keksinnöllä saadaan myös vektoreita, jotka sisältävät tämän keksinnön sekvenssin. Tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi tarkoitettujen vektoreiden yleinen laatu ei ole kriittinen keksinnölle. Yleisesti ottaen sopivat vektorit ja ilmentämisvektorit ja niiden rakenteet ovat selviä alan ammattihenkilöille ja ne voidaan valita juuri sen mukaan mitä käyttäjä haluaa saavuttaa sekvenssillä kuten kloonamisen tai ilmentämisen.

Sopivat ilmentämisvektorit voivat perustua fageihin tai plasmideihin, jotka molemmat yleisesti ottaen ovat isäntäspesifisiä, vaikkakin niitä useinkin voidaan käsitellä sopiviksi muihin isäntiin. Muihin sopiviin

vektoreihin kuuluvat kosmidit ja retrovirukset ja mitkä vain muut kuljettimet, jotka ovat tai eivät ole spesifisiä tietyille järjestelmälle. Sopivat kontrollisekvenssit, kuten tunnistus, promoottori, operaattori, induktori, terminaattori ja muut sekvenssit ovat olennaisia ja/tai

- 5 käyttökelpoisia ilmentämisen säätämisessä ja ovat helposti ilmiselviä alan ammattihenkilöille ja ne voivat olla sellaisia, jotka liittyvät CYVV:hen tai käytettyyn vektoriin tai ne voidaan johtaa mistä vain muusta sopivasta lähteestä. Vektorit voidaan modifioida tai käsitellä millä vaan sopivalla tavalla.

10

Huomataan, että sekvenssi ID 2 on riittävä sekvenssi koko Nla:n koodaamiseksi. Terminaattorit, promoottorit ja muut tällaiset kontrollisekvenssit, joita halutaan, voidaan lisätä esim. sitomisen helpottamiseksi, sopivaan vektoriin tai ilmentämiseen tai sekä että.

15

Huomataan, että DNA-fragmentti, joka koodaa keksinnön mukaista Nla:ta, yhdessä minkä vaan fragmentin kanssa, joka koodaa halkaisusekvenssiä ja se, joka koodaa polypeptidiä tai polypeptidejä voidaan helposti sisällyttää sopivaan vektoriin. Ihannetapauksessa vastaanottovektorilla on

20

sopivat restriktiopaikat insertin helpottamiseksi, mutta blunt-end-sidontaa voidaan käyttää, vaikkakin tämä saattaa johtaa epävarmuuteen avoimessa lukukehyksessä ja insertin suunnassa. Sellaisessa tapauksessa on testi-isäntien asia siirtää transfektoitu vektori vektoreiden valitsemiseksi, joilla on välttämättömät fragmentit sisällytettynä oikeassa

25

suunnassa ja oikeassa ORF:ssä. Sen varmistamiseksi, että fragmentit ovat oikeassa ORF:ssä saattaa olla toivottavaa luoda sekvenssien a), b) ja c) rakenne, joka sitten voidaan suoraan sisällyttää vektoriin, siten vähentämällä mahdollista epävarmuutta halutun ilmentamisvektorin saamiseksi. Alan ammattihenkilöt voivat valita sopivia vektoreita halutun ilmentamisjärjestelmän mukaisesti.

30

Siirtämällä esim. E. colia saadulla plasmidilla valitsemalla transformantti amphisiliinillä tai muulla sopivalla tavalla ja lisäämällä tryptofaania tai muuta sopivaa promoottorin induktoria (kuten indoliakryylihap-
35 lihappoa) voidaan ilmentää haluttu fuusioproteiini. Ilmentämisen laa-

juus voidaan analysoida SDS-polyakryyliamidigeeli-sähköforeesilla SDS-PAGE [Laemmli et al., Nature, (1970), 22, pp.680-685.

5 Huomataan myös, että kun käytetään toisenlaista vektoria, on yhtä hyväksyttävää käyttää mitä vain sopivaa valinnan merkitsintä tai merkit-sijöitä tai vaihtoehtoista valintamenetelmää tai käyttää mitä vain sopivaa promoottoria, joka vaaditaan tai on sopiva.

10 Viljelyn jälkeen, jos fuusioproteiini kerätään isäntäsoluista, trans-formanttisolut kerätään sopivasti, katkaistaan esim. sonikoidaan ja suoritetaan. Katkaisu voidaan myös suorittaa sellaisilla tekniikoilla, kuten entsymaattisella liuotuksella käyttämällä esim. sellulaasia tai ravistamalla aineella tai lasihelmillä, mutta yleensä sonikointi-
15 menetelmät ovat edullisia, koska mitään ylimääräisiä ainesosia ei tarvita. Tuloksena saadun kelluvan aineen polypeptidiaktiivisuus voidaan analysoida ja halkaisutuotteet voidaan määrittää esim. SDS-PAGE:lla.

20 Tavanomainen proteiinipuhdistus on sopiva ilmentämistuotteen saami-seksi.

Esillä olevan keksinnön DNA voidaan valmistaa eristämällä RNA-genomi clover yellow vein -viruksesta [Uyeda, I. et al. (1975) Ann. Phytopath. Soc. Japan 41: 92-203]. Sopiva CYVV-lähde on American Type Culture
25 Collection No. PV 123. Joka tapauksessa clover yellow vein -virus voidaan määritellä viruksena, joka aiheuttaa kuoliota Vicia fabassa.

Genominen RNA voidaan saada CYVV-hiukkasista, jotka on puhdistettu tarttuneesta kasvista ja sitten käänteis-transkriboida ja kaksisäikei-
30 nen cDNA voidaan valmistaa tunnetuilla menetelmillä.

Sen määrittämiseksi, onko virus CYVV:n saman kannan mutantti tai va-
riantti, sekvenssihomologia on hyvä indikaattori. Monet Potyviruset
ovat tunnettuja ja niiden tauteja aiheuttavat ominaisuudet vaihtelevat.
35 Se, muodostaako joku tietty virus erillisen perheenjäsenen perustuu

- viruksen päällysproteiinien serologiseen suhteeseen ja amini-happosekvenssien homologiaan. Siten viruksien, joilla on primääriset aminohapposekvenssit ja jotka jakavat 90 %:n homologian, uskotaan olevan samaa kantaa, kun taas viruksia, joilla on primääriset aminohapposekvenssit, joilla on pienempi kuin 70 %:n homologia, pidetään erillisinä perheenjäseninä [Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1989), Arch. Virol. 106: 171-200]. Perustuen tässä keksinnössä käytetyn CYVV-päällysproteiinin erilaisiin ominaisuuksiin [Uyeda, I. et al (1991), Interviol. 32: 234-245] CYVV tunnustetaan Potyvirusperheen riippumattomaksi jäseneksi.
- 10 Siksi mikä vain virus, jonka päällysproteiinin primäärinen aminohapposekvenssihomologia on 90 % tai enemmän tai mikä vain virus, joka on positiivinen ELISA:lla käyttämällä anti-CYVV-antiseerumia (esim. American Type Culture Collection No. PVAS 123: clover yellow vein -virus-antiseerumi) määrittellään olevan clover yellow vein -viruksen
- 15 kanta.

Erilaiset kasvilaadut, joilla CYVV voi kasvaa; ovat: Phaseolus vulgaris, Vicia faba ja Pisum sativum, varsinkin Vicia faba viljely Wase-sorameme on edullinen.

20

- Edullinen menetelmä virushiukkasten puhdistamiseksi käsittää tarttuneen kasvin lehden tai lehtien homogenisoinnin tai poistamisen sopivassa puskurissa, minkä jälkeen uutetaan orgaanisella liuottimella kuten kloroformilla ja monta kertaa peräkkäin differentiaalisella sentrifugoinnilla ja sen jälkeen sakkaroosin tiheysgradienttisentrifugoinnilla.
- 25

- Eräs tapa varmistaa, että saatu virushiukkanen on CYVV, on se, että tutkitaan virushiukkanen elektronimikroskoopilla. Toinen tapa on
- 30 inokuloida Vicia faba virushiukkasella sen havaitsemiseksi, jos oireita ilmestyy.

Sopivia menetelmiä genomisen RNA:n uuttamiseksi virushiukkasista on guanidiini-tiosyanaatti/fenoli-menetelmä, guanidiini-tiosyanaatti/

trifluoricesium-menetelmä ja fenoli/SDS-menetelmä. Edullista on kuitenkin käyttää alkaliinin sakkaroosi-tiheysgradienttisentrifugointi-menetelmää [Dougherty, W.G. and Hiebert, E. (1980), *Virology* 101: 466-474.

5

Edellä kuvatulla tavalla saatu RNA voidaan sitten testata sen varmistamiseksi, että se todella koodaa proteaasia lukemalla soluvapaassa lukujärjestelmässä. Autolyysi (itseliuotus) voidaan sitten tunnistaa, kun RNA tunnistaa enemmän kuin vain proteaasia kokonaislukutuotteessa monitoroimalla mitä vain lysaateissa saatujen tuotteiden molekyylipainojen muutosta. Sellainen monitorointi voidaan suorittaa esim. anti-coat-proteiinin vasta-aineen avulla.

Vaadittaessa, translaatiotuotteen tuottaminen voidaan suorittaa ajan myötä käyttämällä anticoat-proteiinivasta-ainetta esim. genomisella RNA:lla, joka luetaan ruiskuttamalla *Xenopus laevis* varhaismunasoluihin [Gurdon, J.B. (1972), *Nature* 233: 177-182] tai käyttämällä kanin retikulosyyttia tai vehnän idun lysaattijärjestelmää [Schleif, R.F. and Wensik, P.C. (1981), in "Practical Methods in Molecular Biology", Springer-Verlag, N.Y.].

Yksisäikeistä DNA:ta voidaan syntetisoida käyttämällä täten saatua genomista RNA:ta templaattina käyttämällä käänteis-transkriptaasia ja ds-cDNA voidaan syntetisoida yksisäikeisestä (ss) cDNA:sta standardimenetelmillä. Sopivia menetelmiä ovat S1-nukleaasimenetelmä [Efstratiadis, A. et al. (1976), *Cell* 7: 279-288; Okayama, H. and Berg, P. (1982), *Mol. Cell. Biol.* 2: 161-170 and others], ja Land-menetelmä [Land, H. et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 2251-2266] ja O. Joon Yoo -menetelmä [Yoo, O.J. et al. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1049-1053]. Erilaisista vaihtoehdoista edullista on käyttää Gubler Hoffman -menetelmää [Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983), *Gene* 25: 263-269].

Siten saatu ds-cDNA voidaan sisällyttää kloonausvektoriin, kuten plasmidiin tai lamdhafagiin ja tuloksena saatu rekombinanttivektori trans-

35

formoidaan sitten mikro-organismiin kuten Escherichia coliin. E. coli kanta DH5 α on erityisen edullinen. Transformantteja voidaan sitten valita niiden vastustuskyvyn mukaan bakteeritauteja aiheuttavia aineita vastaan, kuten tetrasykliini tai ampisiliini, alalla hyvin tunnetuilla tekniikoilla.

Transformaatio voidaan esim. suorittaa Hanahan-menetelmällä [Hanahan, D. (1983), J. Mol. Biol. 166: 557-580], jossa rekombinantti DNA-vektori sisällytetään soluun, joka on tehty päteväksi käsittelemällä kalsiumkloridilla, magnesiumkloridilla tai rubidiumkloridilla.

Sopivia menetelmiä transformanttien valitsemiseksi, joilla on N1a DNA, on esitetty seuraavassa.

15 (1) Seulonta koettimella

On toivottavaa lähteä villintyyppisestä CYVV:stä, jolloin yksi tapa eristää sopiva RNA on käyttää cDNA-koetinta sillä ehdolla, että N1a:n aminohapposekvenssi on saatu (käytetyn sekvenssin osa voi olla mistä vaan N1a:n alueesta). Siten oligonukleotidi, joka vastaa relevanttia aminohapposekvenssiä, syntetisoidaan. Yleensä valittuun aminohapposekvenssiin kuuluu mahdollisen degeneraation vähin määrä, muuten on edullista tuottaa useita koettimia käyttämällä erilaisia mahdollisia koodoneita. Sellaaisessa tapauksessa on todennäköisesti avuksi ottaa huomioon kodonin käyttöfrakvenssi. Vaihtoehtoisesti useita nukleotidisekvenssejä voidaan ottaa huomioon ja inosiinia voidaan käyttää nukleotidien korvaamiseksi, jotka vaihtelevat. Koetin voidaan sitten merkitä radioisotoopilla, kuten ³²P, ³⁵S tai biotiini. Transformanttikannat voidaan sitten tunnistaa kiinnittämällä denaturoitu plasmidi-DNA nitro-

selluloosasuodattimiin käyttämällä radiomerkittyjä koettimia, positiivisia klooneja, jotka voidaan tunnistaa autoradiografialla.

(2) PCR-koettimen käyttö

Tässä tekniikassa oligonukleotidejä sekä sense-säikeistä että antisense-säikeistä, jotka vastaavat tunnetun aminohapposekvenssin osaa, voidaan syntetisoida ja polymeraasiketjureaktio [Saiki, R.K. et al. (1988), Science 239, 487-491] suorittaa. Näitä voidaan sitten käyttää yhdessä DNA-fragmentin vahvistamiseksi, joka koodaa Nla:ta. Sopiva templaatti-DNA on cDNA, joka saadaan genomisen virus-RNA:n käänteis-transkriptiolla, jonka tiedetään koodaavan Nla:ta. Täten valmistetut DNA-fragmentit merkitään esim. ^{32}P -, ^{35}S - tai biotiinilla, ja viljelyhybridisointi tai plaque-hybridisointi suoritetaan tällä koettimella mielenkiinnon kohteena olevan kloonin valitsemiseksi.

(3) Seulonta ulkoisella tuotolla eläinsolussa

Tähän menetelmään kuuluu transformanttikannan viljeleminen geenin vahvistamiseksi ja sen jälkeen geenin transfektio eläinsoluun (yleensä käyttämällä joko plasmidia, joka on replikoitavissa ja sisältää transkriptiopromoottorialueen tai käyttämällä plasmidia, joka voidaan yhdistää sopivaan kromosomiin) geenin koodaaman proteiinin ilmentämiseksi. Mittaamalla relevantti aktiivisuus, voidaan valita kanta.

(4) Valinta käyttämällä Nla:n vasta-ainetta

Vasta-ainetta tuotetaan ydininkluusioita (Nla ja Nlb) vastaan kasvista, joka on tartutettu CYVV:llä tai tuotetaan proteiinia vastaan, joka tuotetaan ilmentämisvektorilla sopivassa järjestelmässä. Vasta-aine tai sen vasta-vasta-aine voi sitten tunnistaa halutun Nla:n tai mielenkiinnon kohteena olevan kannan.

(5) Selektiivinen hybridisoinnin translaatiojärjestelmä

Transformantti cDNA hybridisoidaan mRNA:lla soluista, jotka ilmaisevat Nla:ta kuten edellä on kuvattu ja cDNA:han sidottu mRNA dissosioidaan ja otetaan talteen. Talteenotettu mRNA transloidaan proteiiniin trans-

laatiojärjestelmässä esim. ruiskuttamalla Xenopus laevis -varhaismunasoluihin tai sellaisiin soluvapaisiin järjestelmiin kuten kanin retikulosyytti-lysaatti tai vehnänitulysaatti. Mielenkiinnon kohteena oleva kanta valitaan tutkimalla Nla:n aktiivisuus tai tunnistamalla Nla

5 vasta-aineen avulla.

DNA, joka koodaa CYVV Nla:ta, voidaan saada mielenkiinnon kohteena olevista transformanttikannoista tunnetuilla menetelmillä [c.f. Maniatis, T. et al. (1982), in "Molecular Cloning a Laboratory Manual" Cold

10 Spring Harbor Laboratory, N.Y.]. Esimerkiksi fraktio, joka vastaa vektori DNA:ta erotetaan soluista ja DNA-alue, joka koodaa mainittua proteiinia, saadaan mainitusta plasmidi-DNA:sta.

Siten saadun DNA-sekvenssin määrittäminen voidaan suorittaa käyttämällä

15 esim. Maxam-Gilbert kemiallista modifiointimenetelmää [Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980), in "Methods in Enzymology" 65: 499-276], tai käyttämällä esim. dideoksinukleotidi-ketjuterminointimenetelmää käyttämällä M13-fagia [Messing, J. and Vieira, J. Gene 19: 269-276].

20 Viimevuosina fluorikromit ovat korvanneet vaarallisempien radioisotooppien käytön DNA-sekvenssien tunnistamiseksi. Lisäksi dideoksinukleotidi-ketjuterminointio suoritetaan yleisesti robotilla tietokoneen kontrollissa. Järjestelmät, jotka lukevat emäsekvenssit sähköforeesin jälkeen, ovat myös lisääntymässä ja esimerkkejä ovat "CATALYST 800"-

25 sekvenssirobotti ja 373A DNA -sekvenssoija (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems). Nämä järjestelmät mahdollistavat DNA-emäsekvenssin tunnistusmenetelmät, jotka voidaan suorittaa sekä tehokkaasti että turvalisesti.

30 Esillä olevan keksinnön vektorit voidaan yleisesti ottaen organisoida niin, että ne voidaan ilmentää "standardisoluissa" joko prokaryoottisesti tai eukaryoottisesti. Lisäksi sisällyttämällä sopiva promoottori ja sekvenssi fenotyyppistä ilmentämistä varten vektoriin, geeni voidaan ilmaista valituissa isäntäsoluissa.

Sopivia prokaryoottisia isäntiä ovat Escherichia coli ja Bacillus subtilis. K.o. geenin fenotyypin ilmentämiseksi vektori voi sopivasti sisältää replikonin, joka on peräisin lajista, joka sopii isäntään. E. colissa plasmidi saattaa sisältää replikaation alkuperän ja promootorisekvenssin, kuten lac tai UV5. Vektorit, jotka voivat aikaansaada selektiivisyyttä, joka perustuu fenotyyppiseen ominaisuuteen (fenotyyppiin), transformoituun soluun, ovat edullisia.

Escherichia colia käytetään usein isäntänä ja E. colin kannasta K12 johdettu kanta JM 109 on edullinen isäntä. E. colin vektorit tällä hetkellä yleisesti ottaen valitaan plasmidien pUC-sarjasta tai pBR322:sta, mutta muita kantoja ja vektoreita voidaan käyttää haluttaessa. Sopivia Escherichia colin promoottoreita ovat laktoosipromoottori (lac), tryptofanipromoottori (Trp), tryptofani-laktoosi-promoottori (tac), lipoproteiinipromoottori (lpp), lambda (λ) PL -promoottori (λ -fagista) ja polypeptidiketjun pidennysfaktori Tu (tufB) promoottori, mutta tämä keksintö ei rajoitu näihin promoottoreihin.

Sopiva Bacillus subtilis -kanta on esim. kanta 207-25. Sopivia vektoreita ovat pTUB228 [Ohmura, K. et al. (1984), J. Biochem. 95: 87-93] ja muut. Sopiva promoottori on Bacillus subtilis α -amylaasigeenin säätösekvenssi. Tämä on sopiva esimerkki, jossa signaaliptidisekvenssiä (α -amylaasista) voidaan käyttää solun ulkopuoliseen erittämiseen.

Jos halutaan ilmaista yhdistelmäproteiini eukaryoottisissa soluissa, voidaan käyttää soluja selkärankaista, hyönteisistä, hiivoista, kasveista, jne. Edulliset selkärankaisten solut ovat COS-solut, varsinkin COS-1-solut [e.g. Gluzman, Y. (1981), Cell 172-182], tai Kiinan hamsterin munanjohdinsolulinja (CHO), josta puuttuu dihydrofolaatireduktaasi [Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220], vaikkakaan esillä olevaa keksintöä ei rajoiteta näihin.

Kuten edellä on esitetty COS-soluja käytetään sopivasti selkärankaisten isäntäsoluina ja niitä voidaan käyttää esimerkkinä. Ilmentämisvektorit,

jotka sisältävät SV40-replikoinnin kykenevät replikoitumaan autonomisesti COS-soluissa ja niillä on transkriptiopromoottori, transkription päätesekvenssi ja yksi tai useampi silmukointipaikka. Ilmaisuvektoreita, jotka sisältävät halutun DNA-sekvenssin, voidaan käyttää COS-solujen transformoimiseksi erilaisilla menetelmillä, kuten esim. DEAE-dekstraanimenetelmällä [Luthman, H. and Magnusson, G. (1983), *Nucleic Acids Res.* 11, 1295-1308], kalsiumfosfaatti-DNA-yhteissaostusmenetelmällä [Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973), *Virology* 52, 456-457] ja sähköporaatiomenetelmällä [Neumann, E. et al. (1982), *EMBO J.* 1, 841-845].

Jos CHO-soluja käytetään isäntäsoluina, sitten on sopivaa käyttää vektoria, joka kykenee ilmaisemaan neogeenin, joka toimii G418-resistanssin saamiseksi. Sopivia vektoreita, joissa on tämä merkitsin, ovat pRSVneo [Sambrook, J: et al. (1989): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY] ja pSV2-neo [Southern, P.J. and Berg, P. (1982), *J. Mol. appl. Genet.* 1, 327-341]. Transformantteja voidaan sitten valita niiden vastustuskyvyn mukaan G418:lle.

Valittua transformanttia voidaan viljellä tavanomaisilla menetelmillä ja kun kyseessä on keksinnön toinen suoritusmuoto, polypeptidiä tuotetaan sekä solun sisä- että ulkopuolella. Sopivia viljelyväliaineita voidaan valita niistä, joita tavallisesti käytetään käytettyjen isäntäsolujen mukaisesti. Esimerkiksi, kun kyseessä on COS-solut, väliaine, joka sisältää veren komponentteja kuten härän sikiön seerumia, voidaan lisätä tarvittaessa väliaineisiin, kuten RPMI-1640-väliaineeseen tai Dulbeccon modifioituun Eaglen väliaineeseen (DMEM).

Jos käyttäjä mieluummin käyttää hyönteissoluja, silloin voidaan käyttää soluja, jotka on johdettu kannasta Spodoptera frugiperda [Smith, G.E. et al. (1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165].

Sopivia hiivoja ovat baker'in hiiva (Saccharomyces cerevisiae) ja yhdistelmähiiva (Schizosaccharomyces pombe).

Sopivia kasvisoluja ovat esim. sellaiset, jotka on saatu kannoista Nicotiana tabacum ja Oryza sativa.

On huomattava, että isännät, jotka mainitaan edellä, ovat standardi-
5 isäntiä alalla ja että alan ammattihenkilö kykenee valitsemaan näistä ja muista isännistä sopivan.

Sopivia ilmaisuvektoreita selkärankaisten soluille ovat ne, joilla on promoottori ilmaistavan geenin ylävirrassa yhdessä sellaisten paikkojen
10 kanssa kuin RNA:n silmukointipaikka, polyadenylointipaikka ja transkriptio-päätesekvenssi ja jolla lisäksi on replikointialkuperä vaadittaessa. Sopiva ilmaisuvektorin esimerkki on pSV2dhfr, jolla on aikainen SV40-promoottori [Subramani, S. et al. (1981), Mol. Cell. Bio. 1: 854-864].

15 Sopiva ilmentämisjärjestelmä hyönteissoluille on esim. Spodoptera fugiperdan viljellyt solut. Sopivilla ilmaisuvektoreilla on esim. Baculovirus Polyhedrin -promoottori asetettuna ylävirtaan ilmaistussa geenissä yhdessä polyadenylointipaikan ja AcMNPV-osan kanssa (Acutographa californica ydinpolyhedroosivirus) genomi, jota vaaditaan
20 homologiseen rekombinointiin. Eräs esimerkki on pBacPAK8 [Matuura, Y. et al. (1987), J. Gen. Virol. 68: 1233-1250].

Eukaryoottiseen ilmentämiseen käytetään yleensä hiivaa, kuten bakerin hiivaa (S. cerevisiae). Sopivat ilmaisuvektorit hiivaa varten saattavat
25 sisältää alkoholi-dehydrogenaasi-promoottoria [Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982), J. Biol. Chem. 257: 3018-3025], hapanta fosfotaasi-promoottoria [Miyahara, A. et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5] tai karboksipeptidaasi-Y-promoottoria [Ichikawa, K. et al. (1993), Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1686-1690], esim. Silloin signaali-
30 lipeptidisekvenssiä karboksipeptidaasi-Y:stä voidaan myös käyttää erittämisen saamiseksi solujen ulkopuoliseen tilaan.

Sopivia ilmaisuvektoreita kasveille on esim. pBI121, jossa on 35S-promoottori (johdettu kukkakaalin mosaiikkiviruksen aikaisesta promootto-

rista), nopaliinisynteesigeenin polyadenylointisekvenssi Agrobacterium tumefaciens:ista ja Agrobacterium tumefaciens -geeni transferointisekvenssistä [Jefferson, R.A. *et al.* (1987), EMBO J. 6: 3901-3907]. Sellaisia vektoreita voidaan sisällyttää kasvisoluihin sellaisilla menetelmillä kuten infektiio Agrobacterium tumefaciensilla ja sähköforeesi.

Plasmidilla pKK388-1 (valmistaja Clontech Co.) on trc-promoottori ja se sopii käytettäväksi Escherichia colissa. Tämä ilmaisuvektori kykenee automaattisesti replikoitumaan kannassa, joka on johdettu Escherichia colin kannasta K12, kuten kannasta JM109. Tämä vektori voidaan helposti sisällyttää Escherichia colin sellaisilla tunnetuilla menetelmillä kuin on mainittu edellä. Niin saatu kanta voidaan istuttaa väliaineeseen, kuten hyvin tunnettuun LB-väliaineeseen, ja viljellä jonkin aikaa.

Trc-promoottori voidaan sitten aktivoida lisäämällä esimerkiksi isopropyli- β -galaktopyranosidia (IPTG) promoottorin indusoimiseksi. Lisäviljelyn jälkeen ilmaistu proteiini voidaan sitten uuttaa soluista katkaisemalla solut esim. sonikaattorilla. Jos halutaan tuottaa proteiini, jossa on Pro N-päänteessä, on yleensä sopivaa käyttää Escherichia colia isäntänä.

Soveltamalla edellä olevaa selitystä ja tarpeen vaatiessa ottamalla oheiset esimerkit huomioon, sopivasti transformoitujen solujen viljelystä, joka sisältää halutun polypeptidin, voidaan eristää ja puhdistaa fraktio tunnetuilla menetelmillä riippuen polypeptidin fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista. Sopiviin menetelmiin kuuluu käsittely proteiinisaostusaineella, ultrasuodatus, erilaiset kromatografiat [kuten molekyyliseulakromatografia (geelisuodatus), adsorptiokromatografia, ionivaihtokromatografia, affiniteettikromatografia ja korkean suorituskyvyn nestekromatografia (HPLC)], dialyysi ja edellä olevien menetelmien yhdistelmät.

Sen määrittämiseksi, onko ilmaistulla Nla-proteiinilla tarvittava proteaasivaikutus, puhdistetun Nla-proteiinin voidaan antaa reagoida

substraattiproteiinin kanssa, joka sisältää proteaasin halkaisusekvenssin, kuten ilmentämistuotteen geenistä, joka koodaa fuusioproteiinia, johon kuuluu viruspäälylystysproteiini (N1a:n luonnollinen substraatti) yhdessä nuclear inclusion b:n kanssa (N1b) [Dougherty, W.G. et al. 5 (1988), EMBO J. 7: 1281-1287]. Sellainen fuusioproteiini voidaan eristää virusgenomisesta cDNA:sta ja sisällyttää ilmaisuvektoriin. Tuloksena saatu ilmaisuvektori sisällytetään sitten sopivaan isäntäsoluun fuusioproteiinin tuottamiseksi. Käsittelemällä tuloksena saatua fuusioproteiinia tunnetulla tavalla, kuten proteiinin saostusaineen kanssa tai kromatografiolla, fuusioproteiini voidaan erottaa ja puhdistaa. 10

Siten eristetyn ja puhdistetun substraattiproteiinin voidaan antaa reagoida mainitun proteaasin kanssa sopivassa puskuriliuoksessa sopivassa lämpötilassa reaktiotuotteen talteenottamiseksi. Talteenotetulle 15 reaktiotuotteelle voidaan sitten suorittaa sähköforeesi ja Western-blottaus käyttämällä anticoatproteiinin vasta-ainetta proteaasi-aktiivisuuden tunnistamiseksi liikkuvuuden erona alueella. Tällä menetelmällä on myös mahdollista käyttää synteettistä oligopeptidiä, joka sisältää sopivan käytetyn halkaisusekvenssin.

20 Tämän keksinnön mukaisen proteaasin proteolyyttinen aktiivisuus voidaan tunnistaa ilman puhdistusta. Siten aktiivisuus voidaan mitata kytkemällä proteaasigeeni sekvenssissä ja samassa avoimessa lukekehyksessä, alavirtaan promoottorista, kuten trc-promoottorista ja ylävirtaan proteaasin halkaisusekvenssistä. Jos proteaasi on aktiivinen ilmaisutuotteessa, sitten liikkuvampi alue kuin fuusioproteiini on havaittavissa Western-blottauksessa.

Ottamalla talteen geelistä alue, jossa halkaisu havaitaan, ja analysoimalla sen aminopäätesekvenssi tavanomaisella metodologialla, voidaan 30 päättää, onko proteiini halkaistu halutussa peptidisidoksessa.

Proteiini, joka halutaan tuottaa, voidaan tuottaa esim. fuusioproteiinina yhdessä sellaisen proteiinin kanssa, kuten glutationi-S-transfe- 35 raasi, ja tämän keksinnön mukaista N1a:ta voidaan sitten käyttää lii-

tinsekvenssin pilkkomiseksi in vitro. Yhtenä vaihtoehtona haluttu proteiini voidaan suoraan ilmaista isäntäsolussa fuusioproteiinina yhdessä mainitun proteaasin kanssa ja haluttu proteiini valmistetaan itse pilkkoutumisella.

5

Haluttaessa Nla voidaan helposti tuottaa korkealla saannilla ja hyvällä puhtaudella käyttämällä edellä olevia menetelmiä ja siten saatua keksinnön mukaista rekombinantti-Nla:ta voidaan käyttää proteaasina.

- 10 Jos halutaan kemiallisesti syntetisoida tämän keksinnön DNA:t, nämä voidaan valmistaa tavanomaisilla metodeilla kuten fosfiittitriesterimenetelmällä [Hunkapiller, M. et al. (1984), *Nature* 310: 105-111] tai nukleiinihappojen kemiallisilla synteeseillä [Grantham, R. et al. (1981), *Nucleic Acids Res.* 9: r43-r74]. Haluttaessa näiden nukleotidisekvenssien osittainen modifiointi voidaan suorittaa tavanomaisilla
- 15 menetelmillä kuten paikka-spesifisellä mutageneesillä käyttämällä primääriä, joka käsittää synteettisen oligonukleotidin, joka koodaa halutun modifioinnin [Mark, D.F. et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5662-5666].

20

Hybridisointi, joka mainittiin edellä, voidaan suorittaa esim. käyttämällä koetinta, joka on merkitty [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP:llä esim. satunnaisessa primeerimenetelmässä [Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132: 6-13] tai nick-translaatiolla [Maniatis, T. et al.

- 25 (1982), in "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY]. DNA kiinnitetään kiinteään faasin tavanomaisella menetelmällä, esim. adsorboimalla nitroselluloosamembraaniin tai nailonmembraaniin, ja sitten kuumentamalla tai käyttämällä ultraviolettisäteilyä. Kiinteä faasi upotetaan sitten tyyppillisesti esihybridisointiliuokseen, joka sisältää 6 x SSC, 5 % Denhardtin liuosta ja 0,1 % SDS
- 30 ja haudotaan lämpötilassa 55°C neljä tuntia tai pitempään. Sitten aikaisemmin valmistettu koetin lisätään esihybridisointiliuokseen lopulliseen spesifiseen aktiivisuuteen 1×10^6 cpm/ml ja seosta haudotaan lämpötilassa 60°C yön yli. Sitten kiinteä faasi pestään viisi kertaa
- 35 toistuvasti 6 x SSC:llä 5 minuuttia huoneenlämmössä, ja sen jälkeen

pestään lämpötilassa 57°C 20 minuuttia, ja autoradiografia suoritetaan sen määrittämiseksi, onko DNA hybridisoitunut vai ei. On huomattava, että tämä on erityinen esimerkki ja muut menetelmät ovat yhtä mahdollisia.

5

Haluttu proteiini voidaan valmistaa joko solun sisäisellä suoralla leikkausmenetelmällä tai solun ulkopuolisella leikkausmenetelmällä.

Solun sisäpuolinen suora leikkausmenetelmä

10

DNA, joka koodaa Nla:ta, kytketään DNA:han, joka koodaa haluttua proteiinia halkaisusekvenssin kautta, edullisesti Gln-Gly, Gln-Ser tai Gln-Ala. Tuloksena saatu DNA koodaa fuusioproteiinia ja se sisällytetään vektoriin, joka käsittää promoottorin ja terminaattorin ja käytetään ilmentämisen saamiseksi sopivassa isäntäsolussa. Tuloksena saatu fuusioproteiini itsehalkaistuu proteaasiaktiivisuuden kautta, jolloin saadaan peptidi, jossa Gly, Ser tai Ala on kiinnittynyt peptidisidoksella mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin N-pääätteeseen. Erityisen edullinen proteiini ilmaisuun on IL-11.

20

Kun halutaan halkaista mahdollisia jäännöksiä tuloksena saadun proteiinin N-pääätteestä, sitten tämä voidaan tehdä kuten on kuvattu edellä käyttämällä aminopeptidaasia P, esim. N-päätteisen Pro-jäännöksen jättämiseksi, jos tämä olisi toivottavaa.

25

Joissakin ilmaisujärjestelmissä on jo aminopeptidaasi P läsnä. Jos aminopeptidaasia P ei kuitenkaan ole läsnä ja halutaan halkaista N-päätteinen aminohappojäännös in situ, sitten ilmaisuvektori aminopeptidaasia P varten voidaan sisällyttää isäntäsoluun. Aminopeptidaasi P on tunnettu proteiini ja geenisekvenssi entsyymiä varten on helposti saatavilla alan ammattihenkilöiden keskuudessa.

30

Kun halutaan saada proteiini, joka alkaa Pro:lla N-pääätteessä, on yleensä edullista pidentää viljelyn kestoa, jotta solun aminopeptidaasi P voisi vaikuttaa.

35

Kuten on kuvattu edellä, N-päätteinen Pro-jäännös voidaan poistaa proliini-imidopeptidaasin katalyyttisellä vaikutuksella (3.4.11.5), endogeenisesti ilmaistuna tai ilmaistuna ulkopuolisella ilmaisuvektorilla (entsyymi on tunnettu proteiini ja alan ammattihenkilö saa helposti
 5 geenisekvenssin entsyymiä varten). Vaihtoehtoisesti proliinijäännös voidaan halkaista, kun on otettu talteen ilmaisujärjestelmästä, esim. niin kuin fuusioproteiini erittyy solusta.

Siten voidaan nähdä, että esillä oleva keksintö sallii proteiinin tuot-
 10 tamisen, jolla on haluttu N-päätejäännös.

Kun esillä olevan keksinnön sekvenssi johtaa polypeptidiin, jossa on Ala N-pääte, sitten tämä alaniinijäännös voidaan ottaa talteen alaniiniaminopeptidaasin katalyyttisellä vaikutuksella (3.4.11.14),
 15 joka taas on tunnettu entsyymi ja alan ammattihenkilö saa helposti käsiinsä geenisekvenssin. Tämä tekniikka sallii myös polypeptidin tuot- tamisen, jolla on vapaasti valittu N-päätejäännös.

Haluttu proteiini voidaan sitten eristää ja puhdistaa hyvin tunnetuilla
 20 menetelmillä.

Solun ulkopuolinen leikkausmenetelmä

Nia:ta voidaan tuottaa sisällyttämällä sopiva DNA vektoriin, joka sit-
 25 ten sisällytetään sopivaan ilmentämisjärjestelmään. Tuloksena saatu Nia, jonka transformoitu solu on ilmaissut, voidaan sitten puhdistaa käyttämällä ioninvaihtokolonnia, geenisuodatuskolonnia tai käänteis- faasikolonnia. Vaihtoehtoisesti Nia voidaan ilmaista fuusioproteiinina toisen polypeptidin kanssa, kuten glutationi-S-transferaasin tai mal-
 30 toosia sitovan proteiinin, joka voidaan erottaa ja puhdistaa käyttämäl- lä glutationikolonnia tai maltoosikolonnia. Leikkauksen jälkeen entero- kinaasilla tai Xa-tekijällä puhdistettu tuote Nia voidaan puhdistaa ja käyttää.

Sillä aikaa valmistetaan proteiinin edeltäjä, joka sisältää NIa-tunnistussekvenssin (halkaisusekvenssin). Tämä saattaa olla läsnä tietyssä paikassa tai proteiini voi muodostaa osan fuusioproteiinista esim. glutationi-S-transferaasin tai maltoosia sitovan proteiinin kanssa, joka on yhdistetty sopivalla liitoksella (halkaisusekvenssi). Edeltäjän reaktio NIa:n kanssa sopivassa puskuriliuoksessa halkaisee edeltäjän in vitro. Haluttaessa N-päätteinen aminohappojäännös voidaan poistaa kuten on kuvattu edellä.

10 Kuten aikaisemmin, tuloksena saatu proteiini voidaan eristää ja puhdistaa tunnetuilla menetelmillä.

Kun kyseessä on tämän keksinnön toinen suoritusmuoto, uskomme, että luonnollisesti esiintyvällä pelkistävällä peptidillä on sekvenssi, joka on esitetty sekvenssissä ID 12 ja joka muodostuu 526 aminohaposta, joissa on valiini-jäännös N-päänteessä.

Uskomme, että luonnollisesti esiintyvällä DNA:lla, joka koodaa peptidiä, on nukleotidisekvenssi 70-1647, joka on esitetty sekvenssissä ID nro 11.

Keksinnön mukainen peptidi kykenee pelkistämään hapetetun glutationin ja dikloori-indofenolin. Tämä on peptidin oikea kuvaus, mutta se on vähän hankala niin, että keksinnön mukaiseen peptidiin viitataan myös tässä KM31-7-peptidinä tai -proteiinina.

KM31-7-proteiinin alkuperä on kehossa tai se on sen mutantti tai variantti, josta syystä ainoastaan pieniä vaikeuksia esiintyy myrkyllisyyden ja/tai antigeenisyyden kanssa.

Tämän keksinnön toisessa suoritusmuodossa polypeptidi, jolla on sekvenssit -23...526 sekvenssistä ID 12, uskotaan olevan KM31-7-proteiinin edeltäjä. Sellaisenaan esillä oleva keksintö kattaa myös tämän edeltäjän kuten myös sen mutantit ja variantit sekä polynukleotidisekvenssit, jotka koodaavat jotain näistä.

Seuraava keskustelu koskee olennaisesti tämän keksinnön toista suoritustuotoa. On ymmärrettävä, että monet edellä kuvatut menetelmät CYVV NIa:n yhteydessä sopivat myös keksinnön mukaisen DNA:ta koodaavan peptidin eristämiseen, kloonaukseen ja ilmentämiseen. Mahdolliset erot johtuvat olennaisesti siitä tosiasiasta, että CYVV NIa on kasvivirusproteiini, kun taas keksinnön mukainen proteiini on nisäkkään proteiini. Yleiset vaiheet ilmaistun spesifisen polypeptidin saamiseksi nisäkkään soluista geenirekombinaatiotekniikoilla kuvataan nyt.

- 10 mRNA, joka koodaa KM31-7-peptidiä voidaan saada ja käänteiskopioida ds-DNA:ksi hyvin tunnetuilla menetelmillä. Mitä vain sopivia nisäkkään soluja, solulinjoja tai kudoksia voidaan käyttää alkuperäisen mRNA:n lähteenä, mutta pidämme edullisena käyttää solulinjaa KM-102, joka on johdettu ihmisen luuytimen peruskudossoluista [Harigaya, K. and
- 15 Handa, H. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3447-3480].

mRNA:n uuttamiseksi nisäkkään soluista voidaan käyttää erilaisia menetelmiä kuten guanidiinitiosyanaatti-kuumafenoli-menetelmää tai guanidiinitiosyanaatti-guanidiinihydrokloridi-happomenetelmää, mutta

- 20 guanidiinitiosyanaatti-cesiumskloridi-menetelmä on yleensä edullinen.

Koska pääosan mRNA:sta, jota esiintyy eukaryoottisten solujen sytoplasmassa, tiedetään omaavan 3'-päätteisen poly-A-sekvenssin, nisäkkään mRNA:n puhdistaminen voidaan suorittaa adsorptiolla oligo(dt)selluloosakolonniin, siten käyttämällä hyväksi tätä ominaisuutta. Eluoitu mRNA voidaan sitten edelleen fraktioida menetelmillä kuten sakkaroosin tiheysgradienttisentrifugoinnilla.

- 25

Sen varmistaminen, että mRNA tosiaan koodaa haluttua peptidiä, voidaan saada lukemalla mRNA sopivassa järjestelmässä, kuten Xenopus laevis varhaismunasolujärjestelmässä, kanin retikulosyyttijärjestelmässä tai vehnänalkiojärjestelmässä (supra).

- 30

Ilmaisutuotteen pelkistävän aktiivisuuden mittaaminen voidaan suorittaa

- 35 kuten on selitetty seuraavassa.

i) Dikloori-indofenolin pelkistävän vaikutuksen määrittäminen

Tämän määrittäyksen metodologiaa on kuvannut Beinert, H. in "Methods in Enzymology" (1962), 5, 546.

5

50 μ M dikloori-indofenoli (Sigma) -valmistetta tehdään 20 mM:n fosfaattipuskurin ja 0,5 M NaCl:n kanssa (pH 7,8). Yksi millilitra tätä valmistetta sijoitetaan sitten kyvetiin (SARSTEDT, 10 x 4 x 45 mm) ja näyte lisätään sitten mittauksia varten. 15 μ M 1 mM NADPH:ta

10 (Boehringer-Mannheim), joka tehdään samassa puskurissa, lisätään kyvetiin huoneen lämpötilassa reaktion käynnistämiseksi. Reduktaasiaktiivisuus voidaan sitten määrittää seuraamalla hapetetun dikloori-indofenolin absorptioon pienenemistä aallonpituudessa 600 nm tai seuraamalla NADPH:n pienenevää absorptiota aallonpituudessa 340 nm.

15

ii) Hapetetun glutationin pelkistävän vaikutuksen määrittäminen

Tätä analyysimenetelmää kuvaa Nakajima, T. et al. in "New Basic Experimental Methods in Biochemistry (6) - Assay Methods Using Biological Activity", 3-34.

20

10 mM hapetetun glutationin valmistetta (Boehringer-Mannheim) tehdään 20 mM fosfaattipuskurin ja 0,5 M NaCl:n kanssa pH-arvoon 7,8. 15 μ l tätä valmistetta sijoitetaan kyvetiin (10 x 4 x 4 mm), kun näyte ensin on sijoitettu kyvetiin. 15 μ l 1 mM NADPH:ta, joka on valmistettu samassa puskurissa, lisätään sitten kyvetiin huoneenlämpötilassa reaktion käynnistämiseksi. Glutationin reduktaasiaktiivisuus voidaan sitten määrittää seuraamalla absorptioon pienenemistä aallonpituudessa 340 nm.

25

30 Erilaisia menetelmiä, joita edellä on kuvattu, voidaan käyttää ds-DNA:n johtamiseksi mRNA:sta. Näihin kuuluvat S1-nukleasimenetelmä, Landmenetelmä ja O. Joon Yoo -menetelmä (supra), mutta edullista on käyttää Okayama-Berg-menetelmää Okayama, H. and Berg, P. (1982), Mol. Cell. Biol. 2: 161-170] tähän tarkoitukseen.

35

Näin saatu ds-DNA voidaan sitten sisällyttää kloonausvektoriin ja tuloksena saatu rekombinanttiplasmidi voidaan sisällyttää Escherichia coliin, kuten edellä on kuvattu.

- 5 Kanta, joka sisältää halutun DNA:n, joka koodaa keksinnön mukaista peptidiä, voidaan valita erilaisilla menetelmillä, kuten sellaisilla, joita on kuvattu edellä transformanttien valitsemisen yhteydessä, jotka sisältävät NIa-DNA:ta, millä vain menetelmän sopivalla versiolla. Esimerkiksi, jos PCR:ää käytetään koettimen valmistamiseksi, silloin
10 sopiva templaatti-DNA voi olla joko edellä kuvattu cDNA tai genominen DNA.

- Tämän keksinnön toisessa suoritusmuodossa on mahdollista käyttää primääristä seulaa testattavien transformanttikantojen lukumäärän pienentämiseksi. Primäärinen seula on mahdollinen, koska keksinnön mukainen
15 peptidi liittyy sytokiineihin niin, että mRNA jakaa AUUUA-osan, joka on yhteinen sytokiiniin mRNA:n kanssa [Shaw, G. and Kamen, R. (1986), Cell 46, 659-667]. Siten synteettistä oligonukleotidikoetinta, joka sopii AUUUA-osan kanssa, voidaan käyttää primeeriseulassa. Voidaan
20 sitten suorittaa seulonta analysoimalla ulkopuolisen proteiinin tuotantoa nisäkkään soluissa.

- DNA, joka koodaa peptidiä, voidaan sitten ottaa vektorista ja sekvensoida samalla tavalla kuin on kuvattu edellä NIa-DNA:n yhteydessä.
25 Jälleen, kuten on edellä kuvattu, DNA-fragmentti voidaan sitten sisällyttää sopivaan vektoriin ja käyttää prokaryoottisen tai eukaryoottisen isännän transformoimiseksi halutulla tavalla.

- KM31-7-proteiinia voidaan käyttää joko yksinään tai yhdessä yhden tai
30 useamman muun terapeuttisen lääkkeen kanssa seuraavien tilojene ehkäisyyn tai käsittelyyn tai jotka liittyvät näihin: oiksidatiivinen stressi tai mikä vain aktivoituvasta hapestä johtuva tauti. Sellaisiin tiloihin kuuluvat, mutta keksintö ei rajoitu niihin: arterioskleroosi, diabetes, iskeemiset taudit (mukaanlukien reperfuusiotaudit, iskeeminen
35 sydäntauti, aivoverettömyys ja iskeeminen suolitulehdus), turvotus,

verisuonten liikaläpäisevyys, tulehdus, suun limakalvon taudit, akuutti haimatulehdus, Crohnin tauti, vatsahaava, maksataudit, Paraquatin tauti, keuhkoilmapöhö, kemiallisista aineista johtuva syöpä, syöpäkasvaimet, aikuisen hengityshäiriösyndrooma, huonontunut verisuonten sisäinen hyytyminen (DIC), kaihi, sikiön verkkokalvosairaus, autoimmuuniset taudit, porfyriini-verisyys, maksataudit, Välimeren anemia, Parkinsonin tauti, Alzheimerin tauti, epilepsia, ultraviolettisäteilystä johtuvat taudit, radioaktiivisuudesta johtuvat taudit, paleltumat ja palovammat.

- 10 Tämän keksinnön toisen suoritusmuodon farmaseuttiset koostumukset käsittävät farmaseuttisesti aktiivisen määrän KM31-7-peptidiä ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa.

Tämän keksinnön mukaiset koostumukset voidaan annostella eri muodoissa, kuten suun kautta, tabletteina, kapseleina, rakeina, pulvereina ja siirappeina, tai ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti ruiskujen, infuusioiden ja puikkojen muodossa. Muut sopivat annostelumuodot ovat ilmeisiä alan ammattihenkilöille.

- 20 Siinä tapauksessa, että keksinnön mukainen peptidi on tarkoitettu annosteltavaksi ruiskun tai infuusion muodossa, silloin peptidin pyrogeenivapaa valmistus tehdään farmaseuttisesti hyväksyttävään vesiliuokseen, joka sopii ruoansulatuskanavan ulkopuoliseen annosteluun. Polypeptidiliuoksen valmistaminen sovitetaan pH-vaatimusten isotonisuuden ja stabiilisuuden mukaisesti ja on alan ammattiosaamisen piirissä.

Annostelun annosmäärä ja muoto on helposti määriteltävissä alan ammattihenkilöiden keskuudessa ottamalla huomioon sellaiset kriteerit kuin potilaan tila, ruumiinpaino, sukupuoli, ikä, ruokavalio, muiden infektioiden vakavuus, annostelu-aika ja muut kliinisesti merkittävät tekijät. Yleensä normaali aikuisen suun kautta otettava annos on alueella noin 0,01-1000 mg päivässä. Tämä määrä voidaan annostella yhtenä annoksena tai useampina ala-annoksina 24 tunnin ajan. Kun peptidi annostellaan ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti, noin 0,01-100 mg annostelua

kohden annetaan ihonalaisesti, lihaksensisäisesti tai suonensisäisesti ruiskulla.

5 KM31-7-proteiinin täydelliseksi karakterisoimiseksi oli tärkeätä saada vasta-aine, joka oli spesifinen tälle proteiinille. Tällainen vasta-aine olisi käyttökelpoinen KM31-7-proteiinin funktion, määrän, puhdistuksen ja kudosjakautuman analysoimiseksi.

10 Siksi hybrididoma, joka tuottaa anti-KM31-7-vasta-ainetta, saatiin istuttamalla koe-eläimiin E. colin tuottamaa polypeptidiä, joka oli pMAL31-7:n transformoima, valmistamalla vasta-ainetta tuottavien solujen hybridoma yhdessä myeloma-solujen kanssa ja sen jälkeen seulomalla ja kloonamalla hybridoma. Tuloksena saadun hybridoman vasta-aineet
15 kykenivät tunnistamaan seerumivapaasta, viljelyn kelluvasta osuudesta peräisin olevan polypeptidin COS-1-soluja, jotka oli transformoitu pSR α 31-7:llä.

Siten esillä olevalla keksinnöllä saadaan vielä vasta-aine, edullisesti monoklonaalinen vasta-aine, tai sen ekvivalentti, joka erityisesti tun-
20 nistaa KM31-7-proteiinin tai sen mutantin tai variantin.

Tämän keksinnön mukainen vasta-aine suunnataan KM31-7-proteiinia vastaan tai sen mutanttia tai varianttia vastaan. On huomattava, että vasta-aine voi olla polykloonaalinen tai monoklonaalinen, mutta mono-
25 klonaalinen muoto on edullinen. Tämä sen vuoksi, että polykloonaalisiin vasta-aineisiin liittyy paljon epävarmuutta. Tulosten yhdenmukaisuuden takia, olkoon se sitten esim. terapiaan tai KM31-7-proteiinin puhdistamiseen, on edullista käyttää monoklonaalisia vasta-aineita.

30 Keksinnön mukaiset vasta-aineet voidaan valmistaa mistä vain sopivasta eläimestä. Antigeenisyysoongelmia voi kuitenkin ilmestyä, kun vasta-aine ei ole ihmisperäinen. Tässä suhteessa on edullista käsitellä vasta-aineet niin, että ne enemmän muistuttaisivat ihmisen vasta-aineita. Tämä voidaan saavuttaa joko kemiallisesti tai geneettisesti alalla
35 hyvin tunnetuilla menetelmillä.

Tällä keksinnöllä saadaan myös anti-idiomaattisia vasta-aineita, jotka ovat vasta-aineita, joiden tunnistuspaikka tunnistaa edellä olevien vasta-aineiden tunnistuspaikan. Sellaiset anti-idiomaattiset vasta-aineet voidaan valmistaa annostelemalla alkuperäinen vasta-aine sopi-
 5 vaan eläimeen. On huomattava, että tämä menetelmä voi jatkua tehokkaas-
 ti ad infinitum jokaisella sukupolvella, joka vastaa joko alkuperäistä tai anti-idiotyypistä. Jos vasta-aineita ei kuitenkaan ole valittu oikeata tunnistamista varten jokaisen sukupolven jälkeen, silloin spe-
 sifisyys voidaan menettää. Anti-idiotyypiset vasta-aineet voivat olla
 10 käyttökelpoisia esim. analysoidessa vapaata anti-KM31-7-vasta-ainetta.

Tähän keksintöön kuuluvat myös keksinnön mukaisten vasta-aineiden frag-
 mentit, jotka kykenevät tunnistamaan KM31-7-proteiinin, ja molekyylit,
 joissa on tällaisten vasta-aineiden tunnistuspaikka. Tällaisiin frag-
 15 mentteihin ja molekyyleihin viitataan tässä nimellä keksinnön mukaisten
 vasta-aineiden "ekvivalentteina".

Plasmidia pMAL31-7 käytettiin transformoimaan E. coli ja ilmentämis-
 tuote puhdistettiin ja sitä käytettiin laboratorioeläinten immunoisoimi-
 20 seksi. Otettuja soluja immunisoiduista eläimistä käytettiin hybridooman
 valmistamiseksi yhdistelemällä myeloma-soluja ja kloonin, joka tuotti
 anti-KM31-7-monoklonaalisia vasta-aineita, saatiin korkealla konsen-
 traatiolla ja hyvällä stabiilisuudella. Tämä kloonin nimitettiin
 MKM150-2:ksi ja tallennettiin laitokseen Fermentation Research Institu-
 25 te of the Agency of Industrial Science and Technology, Japan, talletus-
 numerolla FERM BP-5086. Tämän kloonin viljelmä antaa anti-KM31-7 mono-
 klonaalisia vasta-aineita viljelmän kelluvasta osuudesta.

Tuloksena saatu anti-KM31-7 monoklonaalinen vasta-aine reagoi immuno-
 30 kemiallisesti fuusioproteiinin kanssa, joka on saatu introdusoimalla
 pMAL31-7 E. coliin. Tämä vasta-aine reagoi myös immunokemiallisesti
 KM31-7-proteiinin kanssa, joka on saatu nisäkkään solujen viljelyiden
 kelluvista osuuksista, jotka on transformoitu cDNA:ta koodaavalla
 KM31-7:llä.

Monoklonaalisen vasta-aineen tuottamiseksi seuraavasti selitetyt menetelmät on suoritettava. Näihin kuuluu:

- 5 (a) antigeeninä käytettävän biopolymeerin puhdistus;
- (b) hiirten immunisointi ruiskuttamalla antigeeniä ja vasta-ainetta tuottavien solujen valmistaminen sopivalla ajankohdalla pernasta keräämällä ja analysoimalla verta;
- 10 (c) myeloma-solujen valmistus;
- (d) pernan ja myeloma-solujen yhdistäminen;
- (e) seulonta haluttuja vasta-aineita tuottavan hybridomaryhmän
15 valitsemiseksi;
- (f) yksittäisen kloonin valmistaminen (kloonaus);
- (g) hybridoman viljeleminen monoklonaalisen vasta-aineen suurimit-
20 taiseen tuotantoon tai hiirten saaminen, jotka on tartutettu hybridomalla, kuten asia voi olla; ja
- (h) fysiologisen aktiivisuuden tai ominaisuuksien analysoiminen
25 tuloksena saadun monoklonaalisen vasta-aineen merkitysreagensinä.

Anti-KM31-7 monoklonaalisten vasta-aineiden tuotanto kuvataan nyt viittaamalla edellä kuvattuihin menetelmiin. On huomattava, että ei ole välttämätöntä tarkasti seurata seuraavaa kuvausta, ja että on mahdollista käyttää mitä vain sopivaa menetelmää. On esim. mahdollista käyttää vasta-ainetta tuottavia soluja ja myeloma-soluja, jotka eivät ole pernasoluja, kuten myös vasta-ainetta tuottavia soluja, ja muiden nisäkkäiden myeloma-soluja. Seuraava menetelmä edustaa tällä hetkellä edullista menetelmää anti-KM31-7 monoklonaalisten vasta-aineiden saami-
35 seksi.

(a) Antigeenin puhdistus

Fuusioproteiini, joka saadaan ilmaisemalla pMAL31-7- E. colissa ja puhdistamalla tuote, on tehokas antigeeni. E. coli TB-1:n viljely, joka on transformoitu pMAL31-7:llä, sisällytettiin isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosiidilla (IPTG). Ilmaistu fuusioproteiini puhdistettiin sitten affiniteetti-kromatografialla käyttämällä amyloosihartsikolonnia (New England BioLabs). KM31-7-proteiini, joka oli puhdistettu COS-1-solujen seerumivapaasta viljelyn kelluvasta osuudesta, jotka oli transformoitu pSR α 31-7:llä, on myös tehokas antigeeni.

(b) Vasta-ainetta tuottavien solujen valmistus

Kohdassa (a) saatu puhdistettu fuusioproteiini sekoitetaan Freundin täydelliseen tai epätäydelliseen apuaineeseen tai sellaiseen apuaineeseen kuten kalialuna ja laboratorioeläimiä immunisoidaan sitten tuloksena saadulla rokotteella. BALB/c-hiiret ovat edullinen valinta käytettäväksi laboratorioeläiminä, koska pääosa käyttökelpoisista myeloma-soluista, joka on johdettu hiiristä, on johdettu BALB/c-hiiristä. Lisäksi näiden hiirien ominaisuuksia on tutkittu paljon ja yksityiskohtaisesti. Lisäksi, jos sekä vasta-ainetta tuottavat solut että myeloma-solut ovat BALB/c-hiiristä, sitten tuloksena saatu hybridoma voi kasvaa BALB/c-hiirten vatsaontelossa. Siten BALB/c-hiirten käyttö tarjoaa etuja siinä, että saadaan monoklonaalisia vasta-aineita, jotka helposti saadaan vesivatsasta ilman, että tarvitsee käyttää monimutkaisia menetelmiä. Siitä huolimatta tämä keksintö ei rajoitu BALB/c-hiirten käyttöön.

Antigeeni voidaan annostella missä vain sopivassa muodossa kuten ihonalaisesti ruiskuttamalla, vatsakalvonsisäisesti ruiskuttamalla, suonsisäisesti ruiskuttamalla, ihonsisäisesti ruiskuttamalla tai lihaksensisäisesti ruiskuttamalla ja edullinen on ihonalainen ruisku tai vatsakalvonsisäinen ruisku.

Immunisointi voidaan suorittaa kerran tai useammin sopivin väliajoin. Edullinen järjestelmä on immunisoida ja sitten vielä kerran tai useammin 1-5 viikon väliajoin. Myöhempien menetelmien tehokkuutta voidaan parantaa, jos vasta-ainetitteri mainitulle antigeenille immunisoitujen eläinten seerumissa analysoidaan säännöllisesti ja eläimiä, joilla on riittävän korkea vasta-ainetitteri käytetään vasta-ainetta tuottavien solujen saamiseksi. Vasta-ainetta tuottavat solut sen jälkeiseen fuusioon edullisesti eristetään eläimestä 3-5 päivää lopullisen immunisoinnin jälkeen.

10

Menetelmiä vasta-ainetitterin analysoimiseksi ovat esim. erilaiset tunnetut tekniikat kuten radioisotooppi-immuunianalyysi (RIA), entsyymiin sidottu immunosorbenttianalyysi (ELISA), fluoresentti vasta-ainetekniikka ja passiivinen hemaglutinointi, mutta RIA ja ELISA ovat edullisia niiden herkkyyden, nopeuden ja tarkkuuden vuoksi ja koska ne voidaan automatisoida.

Sopiva ELISA-muoto on seuraava. Antigeeni adsorboidaan kiinteään faasiin ja sitten kiinteän faasin pinta tehdään alttiiksi proteiinille, joka ei liity antigeeniin, kuten härän seerumialbumiini (BSA), sellaisen pinta-alueiden blokkaukseksi, joihin ei ole adsorboitunut antigeeniä. Kiinteä faasi pestään sitten, minkä jälkeen se tehdään alttiiksi primäärin vasta-aineen seerisest laimennetulle näytteelle, esim. hiiren seerumi. Mahdollinen anti-KM31-7-vasta-aine näytteessä sitoutuu antigeeniin. Pesun jälkeen, sekundääristä entsyymiin liitettyä anti-hiiren-vasta-ainetta lisätään ja annetaan sitoutua sitoutuneeseen hiiren vasta-aineeseen. Pesun jälkeen entsyymisubstraatti lisätään ja vasta-ainetitteri voidaan sitten laskea mittaamalla parametri, kuten värinvaihto, jonka substraatin hajoaminen aiheuttaa.

30

(c) Myeloma-solun valmistus

Tehtyjä hiiren solulinjoja käytetään edullisesti myeloma-solujen lähteenä. Sopivia esimerkkejä sellaisista solulinjoista ovat myeloma-solu-

linja P3-X63 Ag8-U1 (P3-U1), BALB-hiirten alkuperää olevasta 8-atsaguaniniresistanssista [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7, (1978)], P3-NSI/1-Ag4.1 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)], SP2/O-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269-270 (1978)],
 5 P3-X63-Ag8.653 (653) [J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)] ja P3-X63-Ag8 (X63) [Nature 256, 495-497 (1975)]. Nämä solulinjat voidaan aliviljellä sopivissa väliaineissa kuten 8-atsaguaniniväliaineessa (RPMI-1640 väliaine, joka sisältää 8-atsaguaninia, 1,5 mM glutamiinia, 5×10^{-5} M 2-merkaptoetanolia, 10 µg/ml gentamysiiniä ja 10 % sikiön
 10 vasikkaseerumia), Iscoven modifioitua Dulbeccon väliainetta (IMDM) tai Dulbeccon modifioitua Eaglen väliainetta (DMEM). Solun lukumäärän arvioidaan olevan ainakin 2×10^7 fuusiopäivänä aliviljelemällä normaalissa väliaineessa, myös tunnettu täydellisenä GIT:nä (5,5 ml MEM ei-oleellista aminohappoliuosta (NEAA, Gibco), 27,5 ml NCTC109 (Gibco), 6 ml
 15 penisilliini-streptomysiiniliuosta (Sigma) ja 11 ml glutamiinin 200 mM liuosta (Sigma) 500 ml:ssa GIT-väliainetta (Wako Pure Chemical Industry)], 3-4 päivää ennen solun fuusiota.

(d) Solufuusio

20

Vasta-ainetta tuottavat solut ovat plasmasoluja ja niiden edeltäjät lymfosyyttejä. Ne voidaan saada yksittäisen eläimen sopivasta paikasta, kuten pernasta, lymfapisteistä, perifeerisestä verestä tai näiden sopivasta yhdistelmästä. Pernasoluja käytetään kuitenkin eniten.

25

Vasta-ainetta tuottavia soluja kerätään 3-5 päivää lopullisen immuunisoinnin jälkeen hiiristä, joilla on ainakin edellä kuvattu vasta-ainetitteri. Tuloksena saadut vasta-ainetta tuottavat solut fuusioidaan sitten edellä kohdassa (c) saatujen myelomasolujen kanssa. Tavallisin
 30 käytetty menetelmä tällä hetkellä on yhdistää pernasolut myelomasoluihin käyttämällä polyetyleeniglykolia, johtuen niiden suhteellisen alhaisesta myrkyllisyydestä ja tämän yhdisteen manipuloinnin helppoudesta. Tämä menetelmä suoritetaan seuraavalla tavalla.

Pernasoluja ja myeloma-soluja pestään perusteellisesti väliaineella tai fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella (PBS) sekoitettuna niin, että pernasolujen ja myelomasolujen välinen suhde on karkeasti ottaen alueella 5-10:1 ja sitten suoritetaan sentrifuugierotus. Kelluva osuus erotetaan ja solujen möykky hajotetaan perusteellisesti ja sitten polyetyleeniglykoliin sekoitettu liuos (PEG, molekyylipaino: 1000-4000) lisätään sekoittaen. Usean minuutin jälkeen soluille tehdään sentrifuugierotus. Kelluva osuus erotetaan taas ja asettuneet solut suspensoidaan sopivaan määrään täydellistä GIT:iä, joka sisältää hiiren IL-6 5-10 ng/ml ja sitten siirretään viljelylevyn reikiin. Kun solun kasvu on varmistettu jokaisessa reiässä, väliaine korvataan HAT-väliaineella (täydellinen GIT, joka sisältää 5-10 ng/ml hiiren IL-6, 10^{-6} ... 10^{-3} M hypoksantiinia, 10^{-8} ... 10^{-7} M aminopteriinia ja 10^{-6} ... 10^{-4} M tymidiiniä).

15

(e) Hybridomaryhmien valinta

Viljelylevyä haudotaan CO₂-inkubaattorissa lämpötilassa 35-40°C 10-14 päivää. Tänä aikana raikasta HAT-väliainetta, joka vastaa väliaineen puolta määrää, lisätään joka 1-3 päivä.

20

Myelomasolut ovat 8-atsaguanini-vastustuskykyisestä solulinjasta ja sekä myelomasolut että hybridomat, jotka muodostuvat ainoastaan myelomasoluista, eivät voi jäädä eloon HAT-väliaineessa. Kuitenkin hybridomat, jotka käsittävät vasta-ainetta tuottavia solun osia, joihin kuuluu vasta-ainetta tuottavien solujen ja myelomasolujen hybridomat, voivat jäädä eloon. Hybridomat, jotka muodostuvat ainoastaan vasta-ainetta tuottavista soluista, ovat kuolevaisia niin, että hybridomat, jotka muodostuvat sekä myeloma- että vasta-ainetta tuottavista soluista voidaan valita viljelemällä HAT-väliaineessa.

30

HAT-väliaine korvataan HT-väliaineella (jossa aminopteriini on poistettu HAT-väliaineesta niissä rei'issä, joissa hybridomat, joita on havaittu, kehittävät viljelmiä. Osa viljelmän kelluvasta osuudesta poistetaan sitten ja anti-KM31-7 vasta-ainetitteri analysoidaan esim. ELISA:lla.

35

Edellä olevaa menetelmää kuvataan 8-atsaguaniini-vastustuskykyisen solulinjan suhteen, mutta muita solulinjoja voidaan myös käyttää sillä edellytyksellä, että ne sallivat hybridomien valinnan. Käytetyn väli-
 aineen koostumus luonnollisesti vaihtuu myös sellaisissa tapauksissa.

5

(f) Kloonaus

- Hybridomat kohdasta (e), jotka on määritelty tuottavan anti-KM31-7 spesifistä vasta-ainetta, siirretään eri levyille kloonausta varten.
- 10 Erilaisia kloonausmenetelmiä voidaan käyttää, kuten seulontamenetelmää (jossa hybridomille tehdään rajoittava laimennusanalyysi niin, että kukin reikä sisältää ainoastaan yhden hybridoman), pehmeä agaari-
 menetelmä (jossa ympätyt viljelmät otetaan pehmeään agaariväliaineeseen), siementämismenetelmä, jossa yksi ainoa solu poistetaan mikro-
 15 manipulaattorilla, ja lajittelukloonausmenetelmä (jossa yksittäiset solut erotetaan solunvalitsimella). Rajoittavaa laimennusanalyysiä käytetään useimmiten sen yksinkertaisuuden takia.

- Kloonaus, kuten rajoittava laimennusanalyysi, toistetaan 2-4 kertaa
 20 niillä rei'illä, joissa vasta-ainetitteriä jatkuvasti havaitaan. Klooni, jossa on anti-KM31-7 vasta-aineen tuottoa, valitaan hybridomaksi.

(g) Monoklonaalisen vasta-aineen valmistaminen hybridoman viljelyllä

- 25 Kohdan (f) hybridomavalintaa viljellään tavanomaisessa väliaineessa. Suuritulavuuksinen viljelmä suoritetaan pyörivällä viljelyllä käyttämällä joko suurta viljelypulloa tai spinneriä. Anti-KM31-7 monoklonaalisia vasta-aineita voidaan saada altistamalla solun kelluva osa geelisuodatuksella ja sitten keräämällä ja puhdistamalla IgG-fraktio. Lisäksi
 30 hybridoman voidaan myös antaa kasvaa saman hiirikannan vatsaontelossa (esim. edellä mainittu BALB/c-hiiret) tai esim. Nu/Nu-hiiret. Yksinkertainen menetelmä tämän vaiheen suorittamiseksi on monoklonaalisen vasta-ainekitin käyttö (esim. MAbTrap GII Pharmaciasta).

(h) Monoklonaalisen vasta-aineen tunnistaminen

- Kohdassa (g) saadun monoklonaalisen vasta-aineen isotyypin ja aliluokan määrittäminen voidaan suorittaa kuten seuraavassa kuvataan. Esimerkkejä
- 5 tunnistustekniikoista, joita voidaan käyttää ovat Ouchterlony-menetelmä, ELISA ja RIA. Vaikka Ouchterlony-menetelmä on yksinkertainen, siinä on se haitta, että monoklonaalinen vasta-aine on konsentroitava tapauksissa, joissa konsentraatio on erittäin matala.
- 10 Jos käytetään joko ELISA:a tai RIA:a, viljelmän kelluva osuus voidaan suoraan altistaa viljelmän kiinteälle osuudelle, jolle antigeeni on jo adsorboitunut. Sekundäärisiä vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä IgG-aliluokan jokaiselle tyypille voidaan sitten käyttää aliluokkatyyppin tunnistamiseksi. Vaihtoehtoisesti, isotypisoiva kittiä (esim. hii-
- 15 ren monoklonaalista vasta-ainetta, joka isotypisoi Amersham-kittiä), voidaan käyttää. Proteiinin määrittäminen voidaan suorittaa Folin-Lowry-menetelmällä tai mittaamalla absorbanssi aallonpituudessa 280 nm [$1,4 (OD_{280}) = 1 \text{ mg/ml immunoglobuliinia}$].
- 20 Seuraavissa esimerkeissä monoklonaalinen vasta-aine, joka on saatu hybridomasta, joka on merkitty MKM150-2, määriteltiin olevan yksi IgG-luokan isotyyppi ja tunnistettiin kuuluvan IgG1-aliluokkaan.
- Monoklonaalisella vasta-aineella, joka on saatu esillä olevan keksinnön
- 25 mukaisesti, on korkea spesifisyys KM31-7-proteiinille. Lisäksi, koska monoklonaalinen vasta-aine on saatu hyvin ja hyvissä määrissä viljelemällä edellä mainittua hybridomaa, sitä voidaan käyttää KM31-7-proteiinin eristämiseksi ja puhdistamiseksi, ja KM31-7-proteiinin eristäminen ja puhdistus mainitulla monoklonaalisella vasta-aineella immuunisaosta-
- 30 malla käyttämällä antigeenin vasta-ainereaktiota muodostaa osan tätä keksintöä.

Esillä olevaa keksintöä kuvataan nyt viittaamalla oheisiin ei-rajoittaviin esimerkkeihin. Kaikki liuokset ovat vesipitoisia ja ne on valmistettu ioni-vaihdetusta vedestä, ja kun ilmaistaan prosentuaalisia osuuksia, ne ovat p/t, jos ei muuta sanota. Jos menetelmiä ei ole eritelty, ne voidaan löytää julkaisusta "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" [second edition, Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Menetelmät liuosten ja muiden väliaineiden valmistamiseksi on annettu myöhemmässä osassa, jonka nimi on "Media", jos niitä ei ole annettu esimerkeissä. Menetelmät, joihin viitataan esimerkeissä ilman tekniikoita, on johdettavissa edeltävistä esimerkeistä.

A) CYVV:n lähdemateriaali

15

Lehti, joka on tartutettu clover yellow vein -viruksella ja jota on varastoitu jäädytetyssä tilassa [CYVV-isolaatti nro 30: Uyeda, I. et al. (1975), Ann. Phytopath. Soc. Japan 41: 192-203] jauhettiin 10 tilavuudella siirrostuspuskuria.

20

CYVV:n propagointi suoritettiin käyttämällä Vicia faba viljelykelpoista Wase-Soramamea, joka oli kehittänyt toisen aikuisen lehden. Aikuista lehteä ruiskutettiin karborundumilla (400 mesh) ja istutettiin nesteseen, joka saatiin edellä käyttämällä lasi-spatulaa. Noin 8-10 päivää istuttamisen jälkeen istutettu lehti oli kehittynyt verkkomaiseen mosaikkitilaan. Tämä lehti poistettiin ja käytettiin CYVV:n lähteenä.

25

B) Viruksen puhdistaminen

Lehtiä, jotka on eristetty kohdassa A) edellä jauhettiin jauhimella, joka sisälsi 3 tilavuusosaa uuttopuskuria. Jauhamisen jälkeen lehtiä jauhettiin lisää survimella ja myllyllä. Tuloksena saatua valmistetta sekoitettiin hitaasti huoneenlämmössä käyttämällä moottoria, joka oli varustettu ruostumattomasta teräksestä olevalla sekoitusterällä. Neste-
valmiste erotettiin sitten kaksoiskerroksisen verkon läpi.

35

Kaikki senjälkeiset menetelmät suoritettiin lämpötilassa 4°C.

Raaka neste sekoitettiin puolen tilavuuden kloroformin kanssa ja seos sekoitettiin Waring-sekoittimessa, jonka jälkeen valmiste sentrifugoitii
5 tiin painovoimassa 6000 x g 15 min. Sentrifugoinnin jälkeen vesikerros kerättiin ja polyetyleeniglykoli (PEG # 6000) lisättiin tähän fraktioon lopulliseksi konsentraatioksi 4 % t/t.

Tuloksena saatua seosta sekoitettiin jään kanssa tunnin ajan ja annetti
10 tiin seistä jäällä vielä yksi tunti. Näin saadulle nesteelle tehtiin sentrifugointi painovoimassa 6000 x g 15 min. ja saostuma otettiin talteen virusta sisältävänä fraktiona. Tämä saostuma suspensoitiin 50 ml:aan 10 mM fosfaattipuskuria (pH 7,4), joka sisälsi 0,5 M ureaa ja sitten sekoitettiin yhtä suuren tilavuuden hiilitetrakloridin kanssa ja
15 tuloksena saatua valmistetta sekoitettiin voimakkaasti 5 min., jonka jälkeen valmisteelle tehtiin sentrifugointi painovoimassa 6000 x g 10 min. Vesifaasi ultrasentrifugoitiin lämpötilassa 4°C painovoimassa 30.000 rpm 90 min. käyttämällä Hitachi RP-30 -roottoria. Tuloksena saatu pelletti otettiin talteen virusta sisältävänä fraktiona.

20

Pelletti suspensoitiin 10 mM fosfaattipuskuriin, joka sisälsi 1 % Triton X100 (pH 7,4) ja tälle suspensiolle tehtiin sentrifugointi lämpötilassa 4°C painovoimassa 8000 x g 1 min. ajan. Tuloksena saatu kelluva osuus kerrostettiin graduoituun 10-40 %:n sakkaroosin tiheys-
25 gradienttiputkeen (40 %: 10 ml, 30 %: 10 ml, 20 %: 10 ml, 10 %: 10 ml) ja jonka oltiin annettu seistä yön yli lämpötilassa 4°C, joka aikaisemmin oli valmistettu 10 mM fosfaattipuskurin kanssa (pH 7,4). Kun putki oli kerrostettu kelluvalla osuudella, sille tehtiin ultrasentrifugointi lämpötilassa 4°C nopeudella 23.000 rpm 120 min. Hitachi PRS25 -rootto-
30 rissa.

Sentrifugoinnin jälkeen sakkaroosin tiheysgradienttikolonniputki fraktioitiin käyttämällä fraktionaattoria (Model UA-2: valmistanut yhtiö ISCO Co.), joka oli varustettu OD_{260nm}-detektorilla. Fraktiot, joiden

sakkaroositiheys on noin 20-30 % ja joka absorboi OD_{260nm} :ssä otettiin viruksen sisältämänä fraktiona.

Talteenotettu virusfraktio laimennettiin kaksinkertaiseksi 10 mM:lla fosfaattipuskuria (pH 7,4) ja sille tehtiin sentrifugointi lämpötilassa 4°C nopeudella 40.000 rpm 90 min. käyttämällä Hitachi RP-65 -roottoria. Tuloksena saatu saostuma jälleensaostettiin 10 mM:n fosfaattipuskuriin (pH 7,4) puhdistetun viruksen saamiseksi.

10 C) Virus-RNA:n eristys

CYVV:n genominen RNA käsittää noin 10.000 emästä ja on polyadenyloitu 3'-päätteessä. Pituus ja polyadenylointi yhdessä vaikeuttavat täyspitkän RNA:n uuttamista ilman menetyksiä, kun käytetään joko tavanomaista fenoli/natriumdodekyylisulfaattimenetelmää tai guanidiinitiosyanaattimenetelmää. Siksi virusgenominen RNA valmistettiin alkaalisakkaroositiheysgradienttisentrifugointimenetelmällä.

500 μ l virusliuosta (jonka oli laskettu sisältävän 2 mg virusta sen perusteella, että 1 mg/ml virusta on OD_{260nm} 2,5) lisättiin 500 μ l:aan hajotusliuosta ja seoksen annettiin seistä huoneenlämmössä 20 min. Tämän jälkeen seos kerrostettiin 0-33,4 %:n sakkaroosi-tiheysgradienttikolonniputkeen (33,4 %: 1,4 ml, 30,4 %: 7,6 ml, 27 %: 7,0 ml, 23 %: 6,3 ml, 18,7 %: 5 ml, 12 %: 3,2 ml, 0 %: 2,7 m; jonka oltiin annettu seistä lämpötilassa 4°C yön yli), joka oli valmistettu 1 x SSC:lla. Käytetty puskuri oli myös 1 x SSC ja kerrostetulle putkelle tehtiin sitten ultrasentrifugointi Hitachi RPS-27-roottorissa lämpötilassa 15°C nopeudella 24.00 rpm 9 tuntia. Tämän jälkeen putken pohjaan tehtiin reikä sakkaroositiheysgradientin fraktioimiseksi. Genominen virus-RNA-fraktio tunnistettiin mittaamalla jokaisen fraktion absorbanssi aallonpituudessa 260 nm. Genomisen virus-RNA:n sedimentointi ilmeni sakkaroosikonsentraatiossa noin 20-30 %. Genominen RNA saatiin saannossa noin 25 μ g.

D) Virus-cDNA:n synteesi

cDNA syntetisoitiin käyttämällä genomista RNA:ta, joka oli valmistettu edellä kohdassa C) templaattina. cDNA:n synteesi suoritettiin käyttämällä cDNA Synthesis System Plus:aa (valmistaja Amersham). Tuloksena saatu cDNA puhdistettiin Sephadex G50 -kolonnilla (rekisteröity tavaramerkki, valmistaja Pharmacia) ja poly-C-ketju lisättiin puhdistettuun 5'-päänteeseen käyttämällä dCTP:tä ja pääte-deoksinukleotiditransferasia (valmistaja Bethesda Research Laboratories). Plasmidin pBR322 valmistus (valmistaja Bethesda Research Laboratories) tehtiin vaihtamalla plasmidi restriktioentsyymillä PstI ja sitten lisäämällä 3'-poly-G-ketju molemmissa päissä. cDNA lisättiin sitten tähän valmisteeseen ja seosta haudottiin lämpötilassa 65°C 5 min., jonka jälkeen sitä haudottiin lämpötilassa 57°C 2 tuntia. Tuloksena saatu seos jäädytettiin vähitellen, jolloin sallittiin cDNA:n poly-C-ketjun päättäminen plasmidin poly-G-ketjulla.

E) Transformaatio

20 Escherichia coli kanta HB 101 transformoitiin uudella plasmidilla, joka oli valmistettu vaiheessa D) edellä kalsiumkloridimenetelmällä. E. coli kannan HB 101 siemenviljelmä valmistettiin ravistamalla yön yli nestemäisessä LB-väliaineessa. 0,5 ml tästä siemenviljelmästä käytettiin istuttamaan 50 ml tuoretta nestemäistä LB-väliainetta ja istutusta viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C, kunnes saatiin OD_{550nm} arvoon 0,5. Bakteerisoluja otettiin talteen sentrifugoimalla lämpötilassa 4°C nopeudella 5000 x g 5 min. ja tuloksena saatu pelletti suspensoitiin 25 ml:aan Tris-kalsiumpuskuria ja annettiin seistä jäässä 5 min. Tuloksena saatu suspensio sentrifugoitiin taas nopeudella 30 4000 x g 4 min. ja pelletti suspensoitiin 5 ml:aan Tris-kalsiumpuskuria ja annettiin seistä jäässä 2 tuntia hyvien solujen saamiseksi.

100 µl uutta plasmidia, joka oli saatu edellä olevassa kohdassa D) lisättiin 200 µl:aan käyttökelpoisia soluja, jotka oli saatu edellä ja seoksen annettiin seistä jäässä 30 min. Tämän jälkeen seosta haudottiin

lämpötilassa 42°C 2 min. ja sitten 1 ml nestemäistä LB-väliainetta lisättiin ja tuloksena saatua seosta viljeltiin ravistamalla 37°C vielä yhden tunnin ajan. Tuloksena saatu seos leviteltiin kiinteälle LB-väliaineelle, joka sisälsi 12,5 µg/ml tetrasykliinihydrokloridia ja 1,5 % p/p agaria. Soluja viljeltiin lämpötilassa 37°C yön yli cDNA:n kloonikirjaston saamiseksi.

F) Plasmidin pNS51 valmistus ja valinta

10 cDNA-rekombinanttiplasmidikirjasto analysoitiin käyttämällä alkaliini-SDS-menetelmää. Yksityiskohtaisemmin menetelmä oli seuraavanlainen.

2 ml nestemäistä LB-väliainetta istutettiin bakteeriviljelmällä, joka oli vastustuskykyinen tetrasykliinille, mutta herkkä ampisiliinille,
 15 joka oli saatu edellä olevasta kiinteästä LB-viljelmästä ja tuloksena saatua suspensiota viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C yön yli. Soluja otettiin talteen sentrifugoimalla nopeudella 10.000 x g ja suspensioitiin 70 µl:aan hajotuspuskuria, joka sisälsi lisäksi 16 µl lysisyymiliuosta (10 mg/ml). Sekoittamisen jälkeen 5 sekunnin ajan
 20 suspension saamiseksi suspension annettiin seistä huoneenlämmössä 5 min. Tämän jälkeen 160 µl alkaliini-SDS-liuosta lisättiin suspensioon ja tuloksena saatua seosta sekoitettiin ensiksi inverttoimalla putki useita kertoja ja sitten annettiin seistä jäällä 5 min. 120 µl 5 M kaliumasetaattia lisättiin sitten seokseen, jonka sitten taas annettiin
 25 seistä jäällä 5 min. Tämän jälkeen seosta sentrifugoitiin nopeudella 10.000 x g 5 min. lämpötilassa 4°C.

Sentrifugoinnin jälkeen kelluva osuus siirrettiin tuoreeseen putkeen ja 250 µl isopropanolia lisätiin lisäksi putkeen ja tuloksena saadun seoksen annettiin seistä yön yli jäällä 30 min. Tämän jälkeen seosta taas sentrifugoitiin nopeudella 10.000 x g 5 min. ja tuloksena saatu pelletti liuotettiin 100 ml:aan TE-puskuria [10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0)]. Fenoliuutto suoritettiin sitten lisäämällä yhtä suuri määrä fenoli-/kloroformi/isoamyylialkoholia (25:24:1) tuloksena saatuun seokseen
 35 voimakkaasti sekoittaen ja sentrifugoitiin seos nopeudella 10.000 x g

5 min. lämpötilassa 4°C (tämän jälkeen tähän menetelmään viitataan fenoliuuttona).

100 µg vesikerrosta, joka oli saatu sentrifugoinnista, sekoitettiin
5 10 ml 3 M natriumasetaatin kanssa (pH 5,2) ja 250 µl etanolin kanssa ja
tuloksena saadun liuoksen annettiin seistä hiilihappojäällä 10 min. ja
sen jälkeen sentrifugoitiin nopeudella 10.000 x g 5 min. nukleiinihap-
pofraktion talteenottamiseksi (tämän jälkeen tätä menetelmää, jossa
käytetään samoja suhteellisia osuuksia kelluvaa osuutta, etanolia ja
10 natriumasetaattiliuosta, kutsutaan etanolin saostamiseksi).

Tuloksena saatu pelletti suspensoitiin 50 µl:aan RNase-A-liuosta
(10 µg/ml TE-puskurissa ja sitten haudottiin lämpötilassa 37°C yhden
tunnin ajan. Tämän jälkeen 30 µl polyetyleeniglykoliliuosta (2,5 M
15 natriumkloridia, 20 % polyetyleeniglykolia # 8000) lisättiin haudottuun
suspensioon ja seoksen annettiin seistä jäällä yhden tunnin. Tämän jäl-
keen seos sentrifugoitiin nopeudella 10.000 x g 5 min. lämpötilassa 4°C
DNA-fraktion talteenottamiseksi pellettinä ja etanolin saostaminen
suoritettiin kaksi kertaa vielä puhdistetun plasmidi-DNA:n saamiseksi.

20

Puhdistettu plasmidi-DNA halkaistiin restriktioentsyymillä PstI ja
tehtiin 1 % agarosigeelisähköforeesi käyttämällä TBE-liuosta. Sähkö-
foreesin jälkeen geelille tehtiin Southern blot -hybridisointi [Sout-
hern, E.M. (1975), J. Mol. Biol. 89: 503-517]. Erityisemmin geeli ra-
25 vistettiin denaturointiliuoksessa 40 min., sitten siirrettiin ja ravis-
tettiin neutralisointipuskurissa 2 tuntia.

Ravistamisen jälkeen geeli siirrettiin polyuretaaniesterisienelle, joka
sisälsi 20 x SSC, DNA:n siirtämiseksi Hybond-N-membraanipalalle (rekis-
30 teröity Amersham tavaramerkki), joka oli sienessä. Kun DNA:n oltiin
annettu siirtyä Hybond-N-membraanille, membraania ravistettiin
1 x SSC:ssä 10 min. ja sitten kuivattiin lämpötilassa 80°C yhden tunnin
ajan DNA:n kiinnittämiseksi. Membraani sijoitettiin sitten prehybridi-
sointiliuokseen [5 ml formamidia, 1 ml 50 x Denhardtin liuosta, 2,5 ml

20 x SSC:tä, 100 μ l hiiva-tRNA:ta (50 mg/ml), 100 μ l 10 % SDS:ää ja 1,3 ml jälleentislattua vettä] ja haudottiin lämpötilassa 50°C 3 tuntia.

Genomista virus-RNA:ta, joka on halkaistu Mg^{2+} :lla, käytettiin koettimena. Erityisemmin 4 μ l 5 x danaturointipuskuria lisättiin 16 μ l:aan liuosta, joka oli saatu edellä olevasta vaiheesta C), joka sisälsi 1 μ g virusRNA:ta ja seosta haudottiin lämpötilassa 37°C 3 tuntia. 5 μ l denaturoitua RNA-liuosta, joka sisälsi 100 ng RNA:ta (laskettu sillä perusteella, että 1 mg/ml RNA:lla on OD_{260nm} 20), otettiin talteen etanolin saostamisella, minkä jälkeen kuumennettiin lämpötilassa 70°C 5 min. ja sitten sammutettiin jäällä.

4 μ l 5 x merkintäpuskuria, 1 μ l 3,3 mM [γ - ^{32}P] ATP:tä (0,37 MBq) ja 10 μ l jälleentislattua vettä lisättiin denaturoituun RNA-liuokseen. 20 U T4-polynukleotidikinaasiliuosta [valmistaja Takara Shuzo] lisättiin seokseen, minkä jälkeen haudottiin lämpötilassa 37°C 30 min. Ei-sisällytettyä [γ - ^{32}P] ATP:tä poistettiin toistuvalla etanolisaostuksella viisi kertaa.

Tuloksena saatu merkitty koetin lisättiin hybridisointiliuokseen [5 ml formamidia, 2 ml 50 % dekstraanisulfaattia, 200 μ l 50 x Denhardtin liuosta, 2,5 ml 20 x SSC:tä, 50 μ l hiiva-tRNA:ta (50 mg/ml), 100 μ l 10 % SDS:ää, 1,3 ml jälleentislattua vettä] lopulliseen konsentraatioon 5×10^5 cpm/ml, ja Hybond-N-membraani, joka saatiin edellä, siirrettiin tähän liuokseen ja tehtiin hybridisointi hautomalla lämpötilassa 50°C yön yli ja sen jälkeen pesu ravistamalla lämpötilassa 60°C 2 x SSC:llä, joka sisälsi 0,1 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS). Tämä menetelmä toistettiin kolme kertaa ja Hybond-N-membraani pestiin sitten lisää 0,1 x SSC:llä, joka sisälsi 0,1 % SDS ravistamalla huoneenlämmössä yhden tunnin ajan ja sitten kuivattiin.

Autoradiografia vapautti plasmidin, jonka merkitsimme pNS51:llä, jolla oli sisällysfragmentti, ja joka käsitti noin 6500 emäsparia (bp), jotka oli hybridisoitu genomisella RNA:lla.

G) pNS51-insertin sekvenssin määrittäminen

pNS51:ssä kloonatun cDNA:n restriktiokartan valmistamiseksi plasmidi merkittiin jokaisella seuraavista restriktioentsyymeistä; BamHI, EcoRI,
 5 HindIII, KpnI, NcoI, PstI, SalI, SphI, SmaI, XhoI, XbaI, ja niiden pareilla. Tuloksena saatu kartta on esitetty kuviossa 1.

Sen jälkeen kukin fragmentti, joka saatiin merkitsemällä restriktio-
 entsyymeillä SalI ja PstI, sisällytettiin M13mp19 RF DNA:han. Tämä teh-
 10 tiin merkitsemällä pNS51 restriktioentsyymeillä PstI ja SalI ja ajamal-
 la halkaisutuotteet 5 % polyakryyliamidi-sähköforeesigeelillä käyttä-
 mällä 1 x TBE. Sähköforeesin jälkeen geeli värjättiin 1 µg/ml:lla eti-
 diumbromidia, jotta voitaisiin tunnistaa absorptioalueita UV-valossa.
 Geelin liuskat, jotka sisälsivät kunkin DNA-alueen, leikattiin pois
 15 partaveitsellä ja tehtiin sähköeluutio electroeluterilla (valmistaja
 Amicon), joka oli varustettu Centricon-30:lla (valmistaja Amicon).

Kukin fragmentti sisällytettiin sitten käyttämällä DNA-sidontakittiä
 [valmistaja Takara Shuzo] M13mp19:ään, joka oli merkitty ainoastaan
 20 SALI:lla tai sekä PstI:lla että SalI:lla ja joita oli sitten käsitelty
 alkaliinifosfataasilla.

Tuloksena saatu rekombinantti M13mp19 RF-DNA (jossa fragmentit on si-
 sällytetty käyttämällä T4 DNA-ligaasia) sisällytettiin E. coli-kantaan
 25 JM109 käyttämällä rubidiumkloridimenetelmää. Yksittäinen kannan JM109
 viljelmä, joka oli viljelty M9 minimiagariväliaineessa, istutettiin ja
 viljeltiin nestemäiseen SOB-väliaineeseen ravistamalla yön yli. 0,6 ml
 tätä viljelmää istutettiin 50 ml tuoreeseen nestemäiseen SOB-väliaineeseen
 ja viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C, kunnes OD_{600nm} saavut-
 30 ti arvon 0,5. Solut otettiin sitten talteen sentrifugoimalla nopeudella
 5000 x g lämpötilassa 4°C 10 min. ja pelletti suspensoitiin 25 ml:aan
 TFBI-puskuria ja annettiin seistä jäässä 20 min.

Suspensio sentrifugoitiin taas nopeudella 3000 x g 5 min. ja pelletti suspensoitiin 2 ml:aan TFB2-puskuria ja annettiin sitten seistä jäässä 20 min. pätevien solujen saamiseksi.

- 5 Edellä saatu rekombinantti M13mp19 RF-DNA käytettiin määrissä 1-10 μ l sidonnan jälkeen ja sekoitettiin 100 μ l:aan päteviä soluja ja annettiin seistä jäässä yhden tunnin. Tämän jälkeen seosta haudottiin lämpötilassa 42°C 1,5 min. ja sitten 500 μ l SOC-väliainetta lisättiin seokseen, jota viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C vielä yhden tunnin ajan.

- 2 x YT-väliainetta, joka sisälsi 0,8 % agaria, 30 μ l 100 mM IPTG:tä, 10 μ l 10 % 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -galaktosidia (X-gaali) ja 100 μ l indikaattoribakteereita (yön yli viljeltyä kantaa JM109, jota 15 viljeltiin ravistamalla 2 x YT-väliaineessa lämpötilassa 37°C) lisättiin tuloksena saatuun viljelmään ravistaen ja seos kaadettiin kiinteään 2 x YT-väliaineeseen, joka sisälsi 1,2 % agaria. Kun seoksen oli annettu tulla kiinteäksi, sitä viljeltiin lämpötilassa 37°C yön yli. Rekombinantti fagit esiintyivät sitten valkoisina täplinä.

- 20 Kukin tuloksena saatu valkoinen täplä sisällytettiin nestemäiseen 2 x YT-väliaineeseen, joka sisälsi indikaattoribakteereita määrässä 1/100 ja tätä viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C yön yli. Sentrifugoinnin jälkeen painovoimassa 10.000 x g yhden minuutin ajan kelluva 25 osuus jäädytettiin tai varastoitiin lämpötilassa 4°C fagiliuoksena ja solupellettiä käsiteltiin standardimenetelmällä plasmidin valmistamiseksi RF kaksisäikeisen DNA:n talteenottamiseksi (tämän jälkeen lyhennetään RF-DNA), joka on fagin replikointivälituote. Inserttifragmentin läsnäolo varmistettiin merkitsemällä restriktioentsyymillä.

- 30 Siten saatiin 51SS/M13mp19 (s.o. M13mp19, joka sisältää Sall/Sall-fragmentin, joka puolestaan on 51PS5'/M13mp19 osagenomi, joka sisältää PstI-Sall-fragmentin CYVV-genomin 5'-alueesta). RF-DNA:t puhdistettiin näistä fagiklooneista alkaliinisella SDS:llä ja cesiumkloriditiheys- 35 gradienttisentrifugoinnilla standardimenetelmien mukaisesti.

5 μ g tuloksena saatua puhdistettua DNA:ta halkaistiin ensin BamHI:llä
 5'-tarttuvan pään saamiseksi ja sitten halkaistiin lisää KpnI:llä
 3'-tarttuvan pään saamiseksi. Seuraavaksi protokollan mukaisesti Erase-
 a-emäsjärjestelmän mukaisesti (valmistaja Promega), eksonukleaasia li-
 5 sätettiin emästen asteittaiseksi poistamiseksi jokaisen cDNA linearisoi-
 dun plasmidin 5'-tarttuvasta päästä. Käsittelyä eksonukleaasilla jat-
 kettiin 10 min. ja näytteitä poistettiin eri aikoina 1-10 minuutin
 ajan. Koska vektorilla on 3'-tarttuva pää, eksonukleaasi ei tartu sii-
 hen. Erilaisia näytteitä, jotka saatiin 1-10 minuutin ajan blunt-päätet-
 10 tiin sitten käsittelemällä S1-nukleaasilla ja sidottiin ympyrän muotoon
 käyttämällä T4 DNA -ligaasia.

Tuloksena saatu ympyrämäinen rekombinantti M13mp19 RF-DNA sisällytet-
 tiin E. coli -kantaan JM 109 käyttämällä edellä kuvattua rubidiumklori-
 15 dimenetelmää. Siten rekombinanttifageja, joilla on eripituisia cDNA-
 inserttejä, saatiin valkoisina täplinä.

RF-DNA uutettiin rekombinanttifagin aliklooneista, jotka oli saatu
 tavanomaisella tavalla kloonien valitsemiseksi, joilla oli eripituisia
 20 inserttejä. Valitut kloonit viljeltiin erikseen istuttamalla nestemäi-
 seen 2 x YT-väliaineeseen, joka sisälsi E. coli indikaattorikantaa ja
 viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C yön yli. Tämän jälkeen 1,5 ml
 jokaista viljelmää sentrifugoitiin lämpötilassa 4°C painovoimalla
 10.000 x g 5 min. Yksi ml kelluvasta osuudesta siirrettiin tuoreeseen
 25 putkeen ja 250 μ l 20 % polyetyleeniglykoli-vesiliuosta (20 % polyety-
 leeniglykolia # 8000, 2,5 M natriumkloridia) lisättiin sitten putkeen
 sekoittaen ja annettiin sitten seistä jäässä 30 min. Seos sentrifugoi-
 tiin sitten nopeudella 10.000 x g 5 min. lämpötilassa 4°C ja tuloksena
 saatu pelletti suspensoitiin 100 ml:aan TE-puskuria. Yksisäikeiset DNA
 30 (tämän jälkeen lyhennetty ssDNA) fagigenomit otettiin sitten talteen
 jokaisesta valmisteesta fenoliuutolla ja etanolin saostuksella kuten
 edellä.

Kunkin alikloonin nukleotidisekvenssointi, joka saatiin edellä, suori-
 35 tettiin dideoksiketjuterminaatiomenetelmällä käyttämällä ssDNA:ta temp-

laattina. Erityisemmin fagi ssDNA merkittiin [α - 32 P]dCTP (220 TBg/mmol, valmistaja Amersham) käyttämällä 7-deatsa-sekvenaasiversion 2,0 dCTP-kittiä (valmistaja USB). Tuloksena saatua reaktiotuotetta ajettiin 5 %:lla polyakryyliamidi-sähköforeesigeelillä, joka sisälsi 8 M ureaa ja käyttämällä 1 x TBE puskurina. Geeli kuivattiin ja nukleotidisekvenssi määritettiin autoradiografialla.

Analyysoimalla 5'-PstI-SalI-fragmentin nukleotidisekvenssit ja pNS51-M-SalI-SalI-fragmentin, pystyimme määrittämään kaikkiaan 3839 emästä.

Avoimen lukukehyksen hakemisen tuloksena (tämän jälkeen lyhennetään ORF) edellä saadussa sekvenssissä, yksi ainoa ORF polypeptidiä varten merkittiin virusgenomin +sense-säikeeseen. Polypeptidisekvenssi, joka on koodattu ORF:ssä, määritettiin sitten. Homologinen haku vertailemalla tätä polypeptidisekvenssiä tunnettuihin sekvensseihin käyttämällä geenipankkia antoi homologian TEV-HAT:n kanssa.

Tiedetään, että virukset kuten TEV, plum pox virus tai poliovirus (eläinvirus) kypsyvät proteaasin vaikutuksesta ja että proteaasi yleensä halkaisee peptidisidoksen, joka sisältää Gln-Ala, Gln-Ser tai Gln-Gly sidoksen [Willink, J. and van Kammen, A. (1988), Arch. Virol. 98: 1-26]. Pystyimme myös tunnistamaan kolme halkaisusekvenssiä saadussa polypeptidisekvenssissä, CYVV nro 39 proteiinin halkaisupaikan tai paikkojen analyysien tuloksena [Uyeda, I. et al. (1991), Intervirology 32: 234-245]. Yhdestä näistä halkaisupaikoista määritettiin polypeptidi Gly:stä aminohapposekvenssin paikassa 4 Gln:hyn paikassa 437 CYVV:n NIa:na.

30 H) CYVV-NIa/IL-11 fuusioproteiinin valmistus

Edellä olevassa vaiheessa G) tunnistettu DNA, joka koodasi CYVV-NIa:ta, liitettiin kehyksessä sen 3'-päätteiseen DNA:han, joka koodaa ihmisen interleukiinia 11 (IL-11), sitovan sekvenssin kautta, joka koodaa Gln-Alaa.

Seuraava tutkittiin:

- ensin, koodaako edellä olevassa vaiheessa G) tunnistettu DNA NIa:ta, jolla on proteolyyttistä vaikutusta, vai ei;
- 5 - toiseksi, leikkaako proteaasi halutun aminohapposekvenssin vai ei;
- kolmanneksi, säilyykö NIa:n proteaasivaikutus yhä, kun NIa on osa fuusioproteiinia yhdessä halutun heterologisen proteiinin kanssa tavall-
- 10 la, joka on samanlainen kuin virustartutetussa solussa, vai ei; ja
- neljänneksi, säilyttääkö heterologinen proteiini, joka on saatu sellaisen fuusioproteiinin halkaisun kautta, yhtenäisyytensä, rakenteensa ja funktionsa.

15

Koska NIa:ta itse tuotetaan virusedeltäjäpolypeptidistä leikkaamalla, NIa-sistronilla ei ole alkukodonia. Siksi on välttämätöntä lisätä alkukodoni, ATG, NIa-geenin 5'-päätteeseen. NIa-geenin 3'-pääte pitää myös kytkeä IL-11 geenin 5'-päätteeseen samassa ORF:ssä. Näiden ongelmien

20 ratkaisemiseksi NIa modifioitiin käyttämällä polymeraasin ketjureaktio (PCR) -tekniikkaa käyttämällä XhoI-halkaisupaikkaa, joka on läsnä NIa-geenin keskustassa.

Alkukodonin ATG ja tunnistuspaikan lisäämiseksi restriktioentsyymiä

25 NcoI varten, joka on sopiva NIa:n 5'-päätteen kloonamiseen (NIa5'), valmistettiin PCR-primeereitä. Valmistetut sekvenssit olivat

5'GTCCATGGGGAAAAGTAAGAGAACA3' (kutsutaan nimellä NSATG; sekvenssi ID numero: 3) ja 5'ACTCTGAGACCGTGCTCGAG3' (kutsutaan nimellä NSX1; sekvenssi ID numero: 4).

30

0,8 µl dNTP-liuosta (25 mM dATP, dTTP, dCTP ja dGTP), 10 x Taq-puskuria (valmistaja Promega) ja 1 µg jokaista tuloksena saatua primeeriä lisättiin 1 µg:aan plasmidia pNS51 DNA ja seos tehtiin 100 µl:ksi jälleentislattulla vedellä. 5 U DNA-polymeraasia tehtiin 10 x Taq-puskuriin ja

lisättiin PCR-vaikutuksen vahvistamiseksi. PCR-ohjelmaa varten seuraava sykli toistettiin 20 kertaa: 92°C 1 min., 37°C 1 min., 72°C 2 min., ja sen jälkeen tehtiin yksi ainoa seuraavanlainen sykli: 92°C 1 min., 37°C 1 min. ja 72°C 30 min.

5

Tuloksena saadulle vahvistetulle DNA:lle tehtiin fenoliuutto ja etanolisaostus ja sitten ajettiin 5 %:lla polyakryyliamidi-sähköforeesi-geelillä. Yksi alue, joka sisälsi DNA:ta, tunnistettiin etidiumbromidivärjäyksellä ja tämä alue otettiin geelistä ja sille tehtiin sähköelutio Centreluterilla (valmistaja Amicon), joka oli varustettu Centricon-10 30:llä (valmistaja Amicon). Eluoinnin jälkeen eluoitu DNA-fragmentti otettiin talteen sentrifugoimalla nopeudella 7.500 x g käyttämällä Centrifonia (valmistaja Amicon) lämpötilassa 4°C 45 min. Tuloksena saatu DNA-konsentraatio puhdistettiin lisää fenoliuutolla ja etanolisaostuksella. 15

Erikseen 1 µg plasmidia pKK388-1 (valmistaja Clontech), jossa SacI-tunnistuspaikka on korvattu XhoI-tunnistuspaikalla, halkaistiin restriktioentsyymeillä NcoI ja XhoI ja defosforyloitiin vasikan suolen 20 alkaliinifosfotaasilla [tämän jälkeen lyhennetään CIAP; valmistaja Takara Shuzo]. Tuloksena saatu DNA sidottiin sidontakitin avulla (valmistaja Takara Shuzo) 100 ng:llä pKK388-1, joka oli myös halkaistu NcoI:llä ja XhoI:llä ja defosforyloitu kuten edellä ja siten saatu rekombinantti DNA kloonattiin E. coli JM 109:ään. Plasmidi pKN15', 25 jossa oli sisällytys normaalissa suunnassa pKK388-1 promoottorin alasuunnassa alavirtaan saatiin siten (kuvio 2).

Plasmidi pCD20-2 [Kawashima, I. et al. (1991), FEBS L. 283: 199-203) sisältää cDNA:ta, joka koodaa IL-11-edeltäjää (Pre-IL-11), jolla on 30 erittävä signaalisekvenssi. Tämä plasmidi halkaistiin restriktioentsyymeillä BamHI ja ApaI, ja alue, jossa on sekä IL-11-edeltäjä (Pre-IL-11) että SV40-promoottori, poistettiin. Fragmentti sidottiin pBLUESCRIPT II SK+:n BamHI ja ApaI -paikkoihin ja sitten taas halkaistiin restriktioentsyymeillä XhoI ja KpnI, jolloin saatiin geenin, joka koodaa protei- 35 inia, jossa ei ole täysikypsän IL-11:n N-päätettä (Mat-IL-11).

Tuloksena saatu Mat-IL-11-fragmentti (josta puuttuu sen N-pääte) yhdistettiin käyttämällä T4-ligaasia pKN15':iin, joka oli aikaisemmin hal-
 kaistu restriktioentsyymeillä XhoI ja KpnI ja myös käsitelty CIAP:llä.
 Merkitsimme tuloksena saadun rakenteen pKN15IL (kuvio 3). Erityisen
 5 sekvenssin sitomiseksi Nla:n C-päätteeseen Mat-IL-11:llä Alan kautta
 samalla, kun pidettiin sama lukukehys, syntetisoitiin neljä PCR-pri-
 meeriä:

5'AGGAAAAGAGTTCCTCGAGC3' (lyhennetään NSX2;
 10 sekvenssi ID numero: 5),

5'AATTGTTTCATTCCAAGCACCTGGGCCACACCTGGC3'
 (lyhennetään NSJ001P;
 sekvenssi ID numero: 6),

5'GCCAGGTGGTGGCCCAGGTGCTTGAAGGAACAATT3'
 15 (lyhennetään NSJ002N;
 sekvenssi ID numero: 7),

5'TTGTGAGCACACCTGGGAGCTGTAGAGCTC3'
 (lyhennetään ILSAC;
 sekvenssi ID numero: 8).

20

Ensimmäinen PCR-reaktio suoritettiin käyttämällä primeeriparia NSX2 ja
 NSJ002N käyttämällä pNS51 DNA:ta templaattina inserttialueen vahvis-
 tamiseksi, joka koodaa Nla:n C-päätettä (merkitty CN13-alue). Erikseen
 suoritettiin toinen PCR-reaktio käyttämällä primeeriparia NSJ001P ja
 25 ILSAC käyttämällä pNS51 DNA:ta templaattina sen inserttialueen vahvis-
 tamiseksi, joka koodaa IL-11-peptidin N-päätettä (merkitty 5' IL
 -alue). PCR-ohjelmaa varten suoritettiin 20 kertaa seuraava sykli:
 92°C 1 min., 37°C 1 min. ja 72°C 2 min., jonka jälkeen suoritettiin yksi
 ainoa sykli: 92°C 1 min., 37°C 1 min. ja 72°C 30 min. Jokaisesta PCR-
 30 menetelmästä saadut tuotteet uutettiin fenolilla ja saostettiin etano-
 lilla ja sitten tehtiin 5 %:nen polyakryyliamidigeeli-sähköforeesi.
 Geelialue, joka sisälsi vahvistetun DNA-alueen geelin kanssa, leikat-
 tiin pois ja DNA poistettiin sähköllä geeliliuskasta käyttämällä sähkö-
 eluointimenetelmää, joka on kuvattu edellä. Tulokset on esitetty ku-
 35 viossa 4.

Tuloksena saadut kaksi vahvistettua DNA-fragmenttia olivat primeerien NSJ001P ja NSJ002N alueita, s.o. CIN3 DNA-fragmentin 3'-pääteosa ja 5'-IL DNA-fragmentin 5'-pääteosa, joilla on osittainen homologia nukleotidisekvenssien kanssa. Siten jos PCR suoritetaan taas käyttämällä

5 NSX2- ja ILSAC-primeereitä, homologiset osat hybridisoituvat niin, että voidaan saada fuusio-DNA, joka käsittää molempien geenien osat, jolloin homologinen osa käyttäytyy sitovana osana (kuvio 5). Siksi talteenotettu CIN3 DNA-fragmentti ja 5'IL DNA-fragmentti sekoitettiin ja PCR suoritettiin taas käyttämällä ainoastaan NSX2 ja ILSAC primeereinä. PCR-

10 ohjelma muodostui kymmenestä seuraavasta syklistä: 92°C 1 min., 37°C 1 min. ja 72°C 2 min.; jota seurasi 20 sykliä: 92°C 1 min., 45°C 1 min. ja 72°C 2 min.; jota seurasi yksi ainoa sykli: 92°C 1 min., 55°C 1 min. ja 72°C 30 min. Fenolikäsittelyn ja etanolisaostuksen jälkeen suoritettiin 5 %:nen polyakryyliamidigeeli-sähköforeesi CN13IL DNA -fragmentin

15 saamiseksi, jossa CN13 ja 5'IL yhdistettiin. Menetelmä on esitetty kuviossa 5.

CN13IL DNA -fragmentti halkaistiin restriktioentsyymillä XhoI ja tuloksena saatu fragmentti sisällytettiin käyttämällä T4 DNA -ligaasia

20 pKN15':iin, joka oli aikaisemmin halkaistu restriktioentsyymillä XhoI ja defosforyloitu CIAP:llä. Tuloksena saatu plasmidi kloonattiin E. colin kantaan JM 109. Kloonin valitsemiseksi, jossa CN13IL-fragmentti oli sisällytetty oikeaan suuntaan, plasmidia uutettiin tuloksena saaduista klooneista ja PCR suoritettiin käyttämällä primeereitä NSX2

25 ja ILSAC. Käyttämällä tätä järjestelmää, ainoastaan DNA-alue sellaisesta kloonista, jossa fragmentti oli sisällytetty oikeaan suuntaan, on havaittavissa. Saatiin plasmidi pKSUN, jossa NIa ja Mat-IL-11 on sidottu samaan lukukehykseen halkaisusekvenssin kautta Gln-Ala (kuvio 6).

30 I) Ala-IL-11:n ilmaisu bakteerisolussa

E. coli, joka kantaa plasmidia pKSUN9 (tämän jälkeen lyhennetään kantana KSUN9), viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C yön yli 5 ml:ssa LB-väliainetta, joka sisältää 42 µg/ml ampisiliiniä. 2,5 ml tuloksena

35 saatua KSUN9-viljelmää lisättiin 250 ml:aan LB-väliainetta (joka sisäl-

tää saman määrän ampisiliiniä) ja viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C, kunnes OD_{600nm} saavutti arvon 1,0. Kun OD_{600nm} oli saavuttanut arvon 1,0, IPTG lisättiin lopulliseen konsentraatioon 0,1 mM ja seosta viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 28°C vielä 12 tuntia.

5

Toinen viljelmä tuotettiin käyttämällä täsmällisesti samaa menetelmää paitsi, että lopullinen viljely lämpötilassa 29°C suoritettiin lämpötilassa 36 tuntia tai pidempään IPTG:n konsentraatiolla 1 mM täyskypsän IL-11:n saamiseksi (jossa oli N-pääte Pro).

10

J) Western-blottaus

Western-blottaus suoritettiin sen määrittämiseksi, onko pKSUN9 toiminnallinen E. colissa ja myös onko rakennettu rekombinanttigeeni ilmaistu.

15

Sekä 12:n että 36:n tunnin viljelmät indusoitiin IPTG:llä ja edelleen käsiteltiin seuraavalla tavalla. Soluja otettiin talteen 2 ml:sta viljelmää sentrifugoimalla nopeudella 3000 x g lämpötilassa 4°C 5 min. ja pelletti suspensoitiin 100 µl:aan mM natriumboraattipuskuria (säädetty pH-arvoon 9,0 0,1 N NaOH:lla). Tuloksena saatua suspensiota käsiteltiin sonikaattorilla (Handysonic UR-20P, valmistaja Tomy Seiko Co.) asetuksella 8 2 minuutiksi solujen katkaisemiseksi ja sitten sentrifugoitiin nopeudella 10.000 x g lämpötilassa 4°C 10 min. Kelluva osuus, joka sisälsi liukoista proteiinifraktiota otettiin talteen. Kelluvan osuuden 5 ml ajettiin sitten 12 % SDS polyakryyliamidi-sähköforeesigee-

25

lillä ja sitten tehtiä Laemmli-menetelmä [Laemmli, U.K. (1970), Nature 227: 680-685].

30

Sähköforeesin jälkeen geeli ravistettiin siirtopuskurissa (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % metanoli) 5 min. ja blotattiin PVDF-membraanipalalle (Trans-Blot Transfer Medium, valmistaja Bio-Rad Laboratories) käsittelemällä 15 V:ssa yhden tunnin käyttämällä Trans-Blot-SD Semi-Dry Transfer Cell (valmistaja Bio-Rad Laboratories). Blotattu PVDF-membraani pestiin PBS-väliaineessa 10 min. Pesty PVDF-membraani siirrettiin

PBS-Tw:lle, joka sisäsi 5 % kuohumaitoa (valmistaja Snow Brand Milk Products) lämpötilassa 37°C yhden tunnin blokkausta varten.

Blokkauksen jälkeen PVDF-membraani pestiin vielä PBS-Tw:ssä kerran

- 5 10 min. ja kaksi kertaa 5 min. ja sitten siirrettiin anti-IL-11 kanin seerumiin, joka oli laimennettu 10.000-kertaisesti PBS-Tw:hen ja haudottu lämpötilassa 37°C 20 min. PVDF-membraani pestiin taas PBS-Tw:llä kerran 10 min. ja kaksi kertaa 5 min.

- 10 PVDF-membraani siirrettiin anti-kanin TgG vuohen vasta-aineeseen, joka oli merkitty horse radish -peroksidaasilla (valmistaja Amersham), joka oli laimennettu 5000-kertaisesti PBS-Tw:llä ja haudottu lämpötilassa 37°C 20 min. Tämän jälkeen PVDF-membraani pestiin taas PBS-Tw:llä kerran 10 min. ja neljä kertaa 5 min.

15

Tämän lisäpesun jälkeen PVDF-membraani käsiteltiin parannetulla kemiluminesenssi (ECL) -tunnistusreagenssilla (valmistaja Amersham), ja alueet, jotka reagoivat anti-IL-11 vasta-aineen kanssa esiintyivät saattamalla PVDF-membraanin kontaktiin röntgensädefilmin kanssa

- 20 30 s - 5 min.

Edellä olevan Western-blottauksen tuloksena tunnistettiin signaali-alueita, jotka vastasivat molekyylipainoja noin 50 kDa ja noin 23 kDa sekä 12 tunnin että 36 tunnin viljelmistä. 23 kDa:n alueella oli olennaisesti sama liikkuvuus kuin täyskypsällä IL-11:llä, jota käytettiin kontrollina. Siten 23 kDa:n signaalialue ilmeni olevan IL-11, joka oli halkaistu NIa/IL-11 fuusioproteiinista NIa:n proteolyttisellä aktiivisuudella Gln-Ala sidontasekvenssissä. Uskottiin, että raskaampi alue (50 kDa) oli halkaisematon fuusioproteiini.

30

Tästä lähtien 12 tunnin viljelmästä saatua 23 kDa:n proteiinia kutsutaan lyhenteellä 23 kDa-ON ja 23 kDa:n proteiinia, joka on saatu 36 tunnin viljelmästä, kutsutaan lyhenteellä 23 kDa-36hr.

k) 23 kDa-ON ja 23 kDa-36hr proteiinien puhdistus

- 23 kDa-ON ja 23 kDa-36hr proteiinit puhdistettiin niiden N-päänteen aminohapposekvenssien määrittämiseksi. 250 ml sekä 12 että 36 tunnin
- 5 viljelmiä saatiin tekemällä sama menetelmä kuin edellä on kuvattu kohdassa I). Jokaista viljelmää käsiteltiin sitten lisää seuraavalla tavalla. Viljelmä sentrifugoitiin nopeudella 5000 x g lämpötilassa 4°C 15 min. ja pelletti suspensoitiin 10 ml:aan 20 mM boraattipuskuria (pH 9,0) ja katkaistiin sekä Ranskan puristimella että sonikaattorilla.
- 10 Liukeneva proteiinifraktio otettiin talteen kelluvana osuutena sentrifugoinnin jälkeen nopeudella 15.000 x g lämpötilassa 4°C 30 min.

Tuloksena saadulle liukenevalle proteiinifraktiolle tehtiin sitten heikko ioninvaihtokolonnikromatografia käyttämällä FPLC:tä, jota valmist

15 misti yhtiö Pharmacia, käyttämällä seuraavia olosuhteita:

- | | |
|-----------------------|---|
| Kolonne: | CM Toyopearl Pack 650 M
(2,2 x 20 cm, valmistaja Toso) |
| Eluointipuskurit: | A = 10 mM boorihappo - natriumhydroksidi
(pH 9,0), 13 mM kaliumkloridi |
| 20 | B = 10 mM boorihappo - natriumhydroksidi
(pH 9,0), 13 mM kaliumkloridi,
400 mM natriumkloridi |
| Virtausnopeus: | 2,5 ml/min |
| 25 Fraktion tilavuus: | 5 ml/putki |

Konsentraatiogradientti, jota käytettiin, oli lineaarinen gradientti eluentista A eluenttiin B 120 min. ajan.

- 30 Molemmille eluoiduille fraktioille tehtiin entsyymiin sidottu immunosorbenttianalyysi (ELISA) niiden fraktioiden tunnistamiseksi, jotka sisälsivät IL-11.

ELISA suoritettiin seuraavalla tavalla. Kukin 96 reiän immunolevyn reikä (Maxisoap; valmistaja Nunc) kuormitettiin 100 μ l:lla 50 mM natriumkarbonaattipuskuria (pH 9,6), joka sisälsi 1 μ g (ml anti-IL-11 hiiren monoklonaalista vasta-ainetta ja levyä haudottiin lämpötilassa 37°C yhden tunnin. Tämän jälkeen jokainen reikä pestiin neljä kertaa PBS-T-väliaineella (PBS, joka sisältää 0,1 % Tween 20).

Jokainen edellä saadusta FPLC-fraktiosta laimennettiin 100-kertaisesti PBS-T:llä ja kuormitettiin reikiin 100 ml/reikä. Levyä haudottiin lämpötilassa 37°C yhden tunnin, reiät pestiin taas PBS-T:llä ja sitten jokainen reikä kuormitettiin 100 μ l:lla anti-IL-11 kanin IgG:tä, joka oli laimennettu PBS-T:llä lopulliseen konsentraatioon 1 μ g/ml.

Levyä haudottiin lisää lämpötilassa 37°C yhden tunnin ja pestiin PBS-T:llä ja sitten jokainen reikä kuormitettiin 100 μ l:lla alkalifosfotaasi-merkittyä vuohen anti-kanin IgG vasta-ainetta (valmistaja Gibco Bethesda Research Laboratories), joka oli laimennettu 3.000-kertaisesti PBS-T:hen. Levyä haudottiin taas lämpötilassa 37°C yhden tunnin ja pestiin sitten PBS-T:llä. Jokainen reikä kuormitettiin 100 μ l:lla alkaliinifosfotaasisubstraattiliuosta. Levyä haudottiin vielä huoneenlämmössä 30-60 min., jonka jälkeen jokaisen reiän värjäytyminen mitattiin absorbanssina aallonpituudessa 405 nm mielenkiinnon kohteena olevan fraktion tai fraktioiden tunnistamiseksi.

FPLC-menetelmästä saadut fraktiot, jotka tunnistettiin edellä olevalla ELISA-menetelmällä sisältävän substanssin, joka reagoi kanin anti-il-11 vasta-aineen kanssa (fraktiot nrot 19-25) yhdistettiin, väkevöitiin 100-kertaiseksi Centprep-10:llä (valmistaja Amicon) ja sitten ajettiin 12 % SDS polyakryyliamidi-sähköforeesigeelillä Laemmliin menetelmän mukaisesti (supra). Geelille tehtiin sitten sähköblottaus PVDF-membraanipalalle samalla tavalla kuin edellä Western-blottaus-menetelmässä, mutta käyttämällä Problot-membraania (valmistaja Applied Biosystems) PVDF-membraanina.

Blottauksen jälkeen membraani pestiin perusteellisesti jälleentislattul-
la vedellä, väritettiin Coomassie Brilliant -sinisellä R-250, väri
poistettiin 50 %:sella metanolilla ja sitten saatiin kalvo, joka si-
sälsi proteiinin, joka reagoi anti-IL-11 vasta-aineen kanssa Western-
5 blottauksessa.

Proteiinin N-päätteen aminohapposekvenssi analysoitiin käyttämällä
proteiinisekvenssoijaa (valmistaja Applied Biosystems). Alueen N-pääte
sekvenssi 23 kDa-ON:sta, joka reagoi anti-IL-11 vasta-aineen kanssa
10 määriteltiin olevan:

Ala-Pro-Gly-Pro-Pro-Pro-Gly (sekvenssi ID nro 9)

Tämä sekvenssi vastaa täyskypsän IL-11-proteiinin aminohapposekvenssiä
15 -1...+6. Tähän löytöön perustuen voitiin olettaa, että 12 tunnin vil-
jelmästä saatu 23 kDa:n proteiini, joka reagoi anti-IL-11 vasta-aineen
kanssa oli Ala-IL-11. Näytti ilmeiseltä, että tätä proteiinia tuotti
Nia:n proteolyttinen vaikutus, joka halkaisi Nia/IL-11 fuusioprotei-
nin Gln-Ala-paikassa erityisessä halkaisusekvenssissä.

20

Alueen 23 kDa-36hr N-pääte sekvenssi, joka reagoi anti-IL-11 vasta-
aineen kanssa määriteltiin olevan:

Pro-Gly-Pro-Pro-Pro-Gly-Pro (sekvenssi ID nro 10)

25

Tämä sekvenssi vastaa täyskypsän IL-11-proteiinin aminohapposekvenssiä
+1...+7. Siksi kykenimme vetämään seuraavat johtopäätökset.

Seuraamalla induktiota IPTG:n kanssa, Nia/IL-11 fuusioproteiini ilmais-
30 taan E. colissa.

35

12 tunnin viljelyllä induktion jälkeen ilmaistu Nia/IL-11 fuusioprote-
iini halkaistiin Gln-Ala peptidisidoksessa sopivassa halkaisusekvens-
sissä Nia:n proteaasiaktiivisuudella.

Peptidisidoksen halkaisun jälkeen Nia:lla täyskypsä IL-11, jolla on ylimääräinen Ala N-päänteessä ilmaistiin E. colissa.

Viljelemällä vielä 24 tuntia Ala-IL-11:n ilmaisuuden jälkeen Ala-IL-11
 5 kypsytettiin IL-11:ksi, jossa Ala-jäännös, joka oli ollut läsnä Ala-IL-11 N-päänteessä, poistettiin.

Perustuen edellä oleviin löytöihin vedettiin se johtopäätös, että
 23 kDa:n proteiini, joka saatiin 36 tunnin viljelyn jälkeen, oli
 10 IL-11:n täyskypsä tyyppi, jonka N-pääte oli Pro.

Siksi pääteltiin, että IL-11 voitiin ilmaista fuusioproteiinina Nia:n kanssa ja että Nia:n vaikutus pystyi halkaisemaan erityisen sidonta-sekvenssin, joka sisälsi Gln-Ala:ta Ala-IL-11:n saamiseksi. Jatkettu
 15 viljely sai sitten täyskypsän IL-11, jossa alaniinijäännös oli poistettu proliinin N-päänteen saattamiseksi tekijällä, joka oli E. colissa.

Sen varmistamiseksi, että ilmaistu IL-11 ja Ala-IL-11 olivat biologisesti aktiivisia, adipogeneesia inhiboivan tekijän (AGIF) vaikutus määriteltiin indeksinä. Se tosiasia, että IL-11:llä oli adipogeneesia inhiboivaa vaikutusta on aikaisemmin osoitettu [Kawashima, I. et al. (1991), FEBS L. 283: 199-202].

L) Mitataan inhiboivat vaikutukset morfologisiin
 25 muutoksiin 3T3-L1-soluista adiposyytteihin

Menetelmä AGIF-aktiivisuuden määrittämiseksi, jota käytettiin esillä olevassa keksinnössä, on seuraava. Hiiren alkiokautista sidekudossolulinjaa 3T3-L1 [Green, H. ja Kehinde, O. (1974), Cell 1: 113-116], joka
 30 saatiin ATCC:stä, käytettiin. Soluja viljeltiin kaikissa tapauksissa sekoitetussa kosteassa atmosfäärissä, jossa oli 10 % CO₂ - 90 % ilmaa lämpötilassa 37°C ja aliviljeltiin väliaineella A. Adipogeenisen differentiaation sisällyttäminen suoritetaan suorittamalla menetelmää, jonka on kuvannut Rubin et al. [Rubin, C.S. et al. (1978), J. Biol. Chem.
 35 253: 7570-7578].

3T3-L1-soluja suspensoidaan väliaineeseen A tiheyteen $1,0 \times 10^4$ soluja/ml, jotka on ympattu 48 reiän monilohkolevyille (valmistaja Coaster, 0,5 ml/reikä) ja sitten viljellään. Kolmen päivän viljelyn jälkeen solut yhtyivät. Väliaine korvataan sitten tuoreella väliaineella A ja vielä kahden viljelypäivän jälkeen väliaine korvataan adipogeenisin sisällyttämistäväliaineella, väliaineella B, yhdessä 0,5 ml testiyhdisteen annostelun kanssa. Väliaine korvataan tuoreella väliaineella B ja tuoreella näytteellä joka toinen päivä.

10 Väliaineen B sijasta käytetään adiposyyttejä ylläpitävää väliainetta, väliainetta C, pois otetun väliaineen korvaamiseksi rei'issä, lähtemällä erilaisista ajoista eri reikiä varten neljännen ja seitsemännen päivän välissä sen jälkeen kun ensimmäinen testinäyte on lisätty.

15 Kun on viljelty väliaineessa C 2 päivää solut kiinnitetään 5 %:lla formaldehydillä ja mahdolliset rasvahiukkaset, jotka ovat varastoituneet soluihin ja solun ytimiin, värjätään öljy-punaisella (Oil Red O) ja hematoksyliinillä. Mikrokuva otetaan ja ytimien sekä solujen lukumäärä, jossa on varastoituneena värjättyjä rasvahiukkasia, lasketaan.

20 Adipogeneettinen suhde (AR) lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti:

$$AR (\%) = 100 \times \frac{\text{solujen lukumäärä, jotka varastoivat rasvahiukkasia}}{\text{ytimien kokonaismäärä}}$$

25

Solujen kiinnitys ja värjäys öljy-punaisella (Oil Red O) ja hematoksyliinillä suoritetaan menetelmien mukaisesti, joita on kuvannut Yoshio Mitomo ja Shojiro Takayama julkaisussa "Lectures on Clinical Testing", Vol. 12, "Pathology" (1982), julkaissut Ishiyaku Shuppan.

30

M) Menetelmä lipoproteiinilipaasin inhiboivan vaikutuksen määrittämiseksi

35 Määrittäminen suoritetaan menetelmän mukaisesti, jonka on kuvannut Beutler et al. [Beutler, B.A. et al. (1985), J. Immunol. 135: 3972-3977]. Adi-

pogeenisesti (adipogeeninen = rasvaa synnyttävä) eriytyneitä 3T3-L1-soluja valmistetaan kuten on kuvattu edellä kohdassa L) paitsi, että mitään testinäytettä ei lisätä, kun differentiaatio adiposyyteiksi käynnistyy. Sen sijaan testiainetta lisätään tuoreen väliaineen C kanssa ja soluja viljellään 18 tuntia.

Tämän jälkeen väliaine poistetaan ja solut pestään kaksi kertaa PBS(-) (fosfaatti-puskuroidulla suolaliuoksella, valmistaja Nissui Seiyaku) ja jokainen reikä kuormitetaan sitten 300 μ l:lla väliainetta D ja viljellään vielä yhden tunnin ajan. 100 μ l:n alimääriä jokaisesta viljelyn kelluvasta osuudesta otetaan käytettäväksi lipoproteiinilipaasin (LPL) aktiivisuuden mittaukseen, joka mittaus suoritetaan kolme kertaa jokaisesta näytteestä keskiarvon saamiseksi.

LPL-aktiivisuus mitataan kuten on kuvannut Nilsson-Ehle ja Schotz [Nilsson-Ehle, P. ja Schotz, M.C. (1976), J. Lipid Res. 17: 536-541]. Kelluvan osuuden alimäärät, jotka saatiin edellä, sekoitetaan kukin yhtä suureen tilavuuteen LPL-substraattiliuosta ja annetaan reagoida lämpötilassa 37°C 120 minuuttia. Reaktio pysäytetään lisäämällä 1,05 ml 0,1 M kaliumkarbonaattipuskuria (säädetty pH-arvoon 10,5 0,1 M kaliumboraatilla) ja 3,25 ml metanoli : kloroformi : heptaani -seosta [141 : 125 : 100 (t/t)] voimakkaasti sekoittaen. Seos sentrifugoidaan sitten nopeudessa 3000 x g 15 min. huoneenlämmössä. Vesi-metanoli-faasin ^3H -sisältö lasketaan nestetuikelaskimella.

Yksi yksikkö LPL-aktiivisuutta määritellään sitten olevan aktiivisuus, joka tuottaa 1 μ mol rasvahappoa per minuutti. 13 mM glyseroli tri[9,10(n)- ^3H]oleaattia substraattiliuoksessa valmistetaan laimentamalla glyseroli tri[9,10(n)- ^3H]oleaatti (37,0 GBq/mol), valmistaja Amersham, trioleiinin kanssa (valmistaja Sigma), ja sen jälkeen puhdistetaan silikageelikolonnikromatografialla.

Seuraavat esimerkit liittyvät esillä olevan keksinnön glutatonia pelkistävän proteiinin suoritusmuotoon.

Esimerkki 1Poly(A)⁺RNA:n uuttaminen KM-102-soluista

- 5 KM-102-soluja viljeltiin 36 muovisen 15 cm:n halkaisijan viljely-
levyissä Iscoven modifioidussa minimaalisessa olennaisessa väliaineessa
(Boehringer-Mannheim), joka sisälsi 10 % härän sikiön seerumia. Kun
solut olivat yhtyneet, forbolimyristyyliasettaattia (PMA) ja kalsium-
ioniforia A23187 (Sigma) lisättiin lopulliseen konsentraatioon 10 ng/ml
10 ja 0,2 μ M ja viljelemistä jatkettiin lämpötilassa 37°C. 12:n joukon
levyjä kerättiin 3, 6 ja 14 tuntia myöhemmin ja jokainen levy liuotet-
tiin erikseen guanidiini-tiosyanaatti-liuokseen ja nestefaasi kerät-
tiin.
- 15 Poly(A)⁺RNA:n eristäminen suoritettiin perusteellisesti, kuten on kuvat-
tu julkaisussa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" [Maniatis, T.
et al. (1982) pp. 196-198]. Seuraavassa on menetelmän yksityiskohtainen
kuvaus.
- 20 Jokainen talteenotettu nestefaasi käsiteltiin yksilöllisesti seuraavalla
tavalla. Neste vedettiin ylös toistuvasti ja erotettiin 10 ml:n ruiskusta,
jossa oli 21G-ruiskuneula. 3 ml 5,7 M CsCl - 0,1 M EDTA (pH 7,5) -liuosta
lisättiin etukäteen Polyaromar-sentrifugiputkeen, joka sopi RPS40-T-sent-
rifugin roottorikokoon (Hitachi Koki). Soluvalmiste laitettiin sitten
25 liuoksen päälle putkeen, kunnes putki oli täysi.
- Sentrifugoinnin jälkeen nopeudella 30.000 rpm 18 tuntia lämpötilassa
20°C tuloksena saatu pelletti suspensioitiin 400 μ l:aan tislattua vettä
ja sen jälkeen tehtiin etanolisaostus. Tuloksena saatu pelletti liuo-
30 tettiin 400 μ l:aan tislattua vettä ja lisättiin yhtä suureen tilavuus-
teen kloroformi/1-butanoli-seosta (4:1 t/t) sekoittaen ja vesikerros
kerättiin sentrifugierottamisella. Etanolin saostus suoritettiin taas
kerran ja tuloksena saatu pelletti liuotettiin 600 μ l:aan tislattua
vettä koko RNA:n saamiseksi. Noin 4,5 mg koko RNA:ta saatiin kustakin
35 yhdistetystä PMA/A23187-stimuloidusta 3, 6 ja 14 tunnin näytteestä.

600 µg kutakin näitä kolmea koko RNA-tyyppiä, jotka saatiin tällä tavalla, yhdistettiin ja niille tehtiin oligo(dT)-selluloosakolonnikromatografia poly(A)⁺ RNA:n puhdistamiseksi.

- 5 Koko RNA liuotettiin adsorptiopuskuriin ja kuumennettiin lämpötilassa 65°C 5 min. Tuloksena saadulle liuokselle tehtiin oligo(dT)-selluloosakolonne (Pharmacia, tyyppi 7), joka oli kuormitettu adsorptiopuskurilla ja eluoitu eluointiliuoksella 100 µg poly(A)⁺ RNA:n talteenottamiseksi.

10 Esimerkki 2

cDNA-kirjaston valmistaminen

cDNA-kirjasto valmistettiin Okayama-Berg-menetelmällä.

15

5 µg poly(A)⁺ RNA:ta ja 24 yksikköä käänteis-transkriptaasia (Seikagaku Corp.) annettiin reagoida lämpötilassa 42°C yhden tunnin 20 µl:ssa käänteis-transkriptaasi reaktioliuosta.

- 20 Reaktio pysäytettiin lisäämällä 2 µl 0,25 M EDTA:ta ja 1 µl 10 % SDS:ää ja liuos deproteinisoiittiin sitten 20 µl:lla fenoli/kloroformiseosta (1:1 t/t). Sentrifugoinnin jälkeen proteiinipitoisen fraktion poistamiseksi, 20 µl 4 M ammoniumasetaattia ja 80 µl etanolia lisättiin kelluvaan osuuteen, joka sitten jäähdytettiin lämpötilassa -70°C 15. min.
- 25 Tämän jälkeen saostuma kerättiin sentrifugierotuksella, pestiin 75 %:lla etanolilla ja kuivattiin sitten alennetussa painessa.

Kuivattu saostuma liuotettiin 15 µl:aan terminaalista fransferaasi-liuosta ja lämmitettiin lämpötilassa 37°C 3 min. Tämän lopussa 18 yksik-

- 30 köä terminaalista deoksinukleotiditransferaasia (Pharmacia) lisättiin reaktioliuokseen ja annettiin reagoida 5 min. 1 µl 0,25 M EDTA:ta ja 0,5 µl 10 % SDS:ää lisättiin reaktion pysäyttämiseksi ja liuos deproteinisoiittiin sitten fenoli-kloroformilla (kuten edellä on kuvattu) ja sentrifugoitiin proteiinipitoisen fraktion poistamiseksi. Kelluva osuus
- 35 kerättiin ja sekoitettiin perusteellisesti 15 µl 4 M ammoniumasetaatin

ja 60 μ l etanolin kanssa. Tämä seos jäähdytettiin lämpötilassa -70°C 15. min. ja saostuma kerättiin sentrifugoimalla.

Tuloksena saatu pelletti liuotettiin 10 μ l:aan restriktioentsyymipuskuria ja 2,5 yksikköä restriktioentsyymiä HindIII lisättiin tuloksena
5 saatuun liuokseen, jonka annettiin seistä lämpötilassa 37°C yhden tunnin sulatuksen suorittamiseksi.

Reaktioliuos deproteinoitiin sitten fenoli-kloroformilla ja sitten
10 etanolisaostuksella ja kelluva osuus jäähdytettiin lämpötilassa -70°C 15. min. Tuloksena saatu saostuma kerättiin sentrifugoinnilla ja liuotettiin 10 μ l:aan TE-puskuria [10 mM Tris-HCl (pH 7,5) ja 1 mM EDTA].
1 μ l tuloksena saatua liuosta tehtiin 10 μ l:ksi reaktioliuosta, joka sisälsi 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl ja 10 ng
15 oligo(dG)-päistä linker DNA [3'-oligo(dG9-tailed pL-1 HindIII linker, Pharmacia)], jonka jälkeen kuumennettiin lämpötilassa 65°C 5 min. ja sitten lämmitettiin lämpötilassa 42°C 30 min. Reaktioseos jäähdytettiin yön yli vedellä ja sen jälkeen lisättiin siihen 10 μ l 10 x ligaasipuskuria, 78 μ l tislattua vettä ja 8 yksikköä T4 DNA -ligaasia. Reaktio-
20 liuos pidettiin sitten yön yli lämpötilassa 12°C.

Seuraavana päivänä reaktioseos yhdistettiin 10 μ l 1 M KCl:n kanssa, ribonukleasi H:n 1 yksikön kanssa, DNA-polymeraasi I:n 33 yksikön kanssa, T4-DNA-ligaasin 4 yksikön kanssa, 0,5 μ l dNTP-liuoksen kanssa
25 (20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP ja 20 mM dTTP) ja 0,1 μ l 50 μ g/ml härän seerumialbumiinin kanssa (BSA), ja tuloksena saatu seos lämmitettiin ensin lämpötilassa 12°C yhden tunnin ja sitten lämpötilassa 25°C yhden tunnin. Tämän jälkeen reaktioliuos laimennettiin 5-kertaisesti tislattulla vedellä ja käytettiin sitä heti E. coli DH5 α siirtämiseksi
30 käyttämällä Hanahan menetelmää [Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580] KM-102-solujen cDNA-kirjaston valmistamiseksi.

Esimerkki 3Oligonukleotidikoettimen valmistaminen

- 5 Perustuen AUUUA-sekvenssiin sytokiinin mRNA:n 3'-ei-luetussa alueessa, 15-emäksen oligonukleotidi 5'-TAAATAAATAAATAA-3' (sekvenssi ID nro 13), merkitty ATT-3, syntetisoitiin kemiallisesti. Synteesi suoritettiin käyttämällä 380B automaattista DNA syntetisoijaa (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems) seuraamalla ohjeita, jotka olivat liitteenä olevassa käyttöohjeessa. Käytetty menetelmä oli fosfoamidiittimenetelmä, 10 jonka on kuvannut Caruthers et al. [Matteucci, M.D. and Carruthers, M.H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191]. 15-merin synteesin jälkeen tuloksena saatu oligonukleotidi otettiin tuesta ja suojaavat ryhmät poistettiin. Tuloksena saatu oligonukleotidiliuos lyofilisoitiin 15 pulverin muodostamiseksi, joka sitten liuotettiin tislattuun veteen ja varastoitiin jäädytettynä lämpötilassa -20°C, kunnes oli aika käyttää sitä.

Esimerkki 4

20

cDNA-kirjaston seulominen

- 6500 viljelmää tuotettuna cDNA-kirjastosta, joka oli valmistettu esimerkissä 2 edellä, kiinnitettiin nitroselluloosasuodattimelle 25 menetelmän mukaisesti, jonka on kuvannut Grunstein ja Hogness [Grunstein, M. ja Hogness D.S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965]. ATT-3-koetin, joka valmistettiin esimerkissä 3 5'-merkittiin ³²P:llä standardimenetelmillä (kts. "Molecular Cloning - A Laboratory Manual"), ja merkittyä koetinta käytettiin kolonnin hybridisointiin. 30

- Esi-hybridisointi suoritettiin lämpötilassa 37°C 3 tuntia seuraavalla tavalla: 6 x SSC, 1 x Denhardt-liuos, 0,25 % SDS, 0,05 % natriumpyrosfosfaattia ja 100 µg/ml denaturoitua salmon sperm DNA:ta. Hybridisointi 35 suoritettiin sitten yön yli lämpötilassa 31°C seuraavalla tavalla:

6 x SSC, 1 x Denhardtin liuos, 17 $\mu\text{g/ml}$ hiiva-tRNA ja 0,05 % natrium-pyrofosfaattia, joka sisältää ^{32}p -merkittyä koetinta ATTT-3.

Seuraavana päivänä nitroselluloosasuodatin pestiin huoneenlämmössä

- 5 2 tuntia 6 x SSC-liuoksella, joka sisälsi 0,05 % natrium-pyrofosfaattia. Sen jälkeen autoradiografia vapautti 33 positiivista kloonia.

Plasmidi-DNA uutettiin positiivisista klooneista standardimenetelmillä.

Useita klooneja valittiin sitten umpimähkäisesti ja niiden osittaiset

- 10 cDNA-nukleotidisekvenssit määritettiin dideoksimenetelmällä. Näitä osittaisia sekvenssejä tutkittiin sitten homologian suhteen nukleotidisekvenssien EMBL- tai geenipankki-tietokannoissa PC:llä ja havaittiin, että jollakin osittaisilla kloonien sekvensseillä, jotka oli merkitty ATT-3:lla, oli homologiaa Alu-toiston osien kanssa [Schmidt, C.W. ja
15 Jelinek, W.R. (1982) Science 216, 1065-1070].

DNA-fragmentti, joka sisältää Alu-toistosekvenssin valmistettiin ihmi-

sen genomi-DNA:sta ja merkittiin ^{32}p :llä standardimenetelmillä. Tätä

merkittyä DNA:ta käytettiin koettimena viljelmän hybridisoinnissa käyt-

- 20 tämällä 33 edellä tunnistettua kloonia ja sitten oli selvää, että 12 kloonilla oli Alu-toisto. cDNA-insertin pituus kustakin jäljellä olevasta 21 kloonista määritettiin ja saatiin selville, että pituus vaihteli alueella 50-3600 emästä.

- 25 Restriktioentsyymien kartoitus suoritettiin jäljellä olevien 21 kloonien cDNA-sisällyksillä ja osittaiset nukleotidisekvenssit määriteltiin kuten edellä. Nämä osittaiset sekvenssit tutkittiin sitten kuten edellä homologian suhteen nukleotidisekvenssien kanssa, EMBL- tai geenipankki-tietokannoissa PC:llä ja ne kloonit, joilla oli uudet sekvenssit, va-
30 littiin.

Esimerkki 5Kloonin nro 31 Northern-hybridisointi

- 5 Yhdellä klooneista, kloonin nro 31 (merkitty pcD-31), oli noin 560 bp:n cDNA-insertti. PstI-AatI-fragmentti (292 bp) saatiin pcD-31:n cDNA-insertistä ja merkittiin ^{32}P :llä käytettäväksi koettimena Northern-blottausmenetelmässä käyttämällä poly(A)⁺ RNA:ta, joka oli valmistettu KM-102-soluista, ja sen jälkeen tehtiin esimerkin 1 mukainen menetelmä.
- 10 Tätä hybridisointia käytettiin määrittämään luonnollisesti esiintyvän mRNA:n pituus, joka vastaa pcD-31:n inserttiä.

Northern-hybridisointimenetelmä oli seuraava. 5,5 µg poly(A)⁺ RNA:ta valmistettiin KM-102-soluista ja haudottiin 50°C yhden tunnin seoksessa,

15 joka sisälsi 1 M glyoksaalia, 50 % dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja 0,01 M dinatriumvetyfosfaattia (pH 7,0). Tämän ajan lopussa 4 µl sähköforeesipigmenttiä lisättiin haudottuun seokseen, jolle sitten tehtiin sähköforeesi 1 %:n agarosigeelissä 1 x TAE:ssa.

- 20 Sähköforeesin jälkeen agarosigeelillä oleva RNA siirrettiin yön yli nailonmembraanisuodattimeen (Bio-Rad, Zeta-koetin) käyttämällä 20 x SSC:tä käyttämällä kapillaarista siirtomenetelmää (kts. "Molecular Cloning - A Laboratory Manual"). Siirron jälkeen suodatin pestiin varovasti 2 x SSC:llä, ilmakeivattiin ja sitten kuivattiin lisää lämpötilassa 80°C 2 tuntia mRNA:n kiinnittämiseksi.
- 25

pcD-31:n PstI-AatI-fragmentti merkittiin ^{32}P :llä käyttämällä Multiprime DNA -merkintäsystemiä (Amersham).

- 30 Esihybridisointi suoritettiin suodattimella kolme tuntia lämpötilassa 37°C liuoksessa, joka sisälsi 5 x SSCP, 2 x Denhardt-liuosta, 50 % formamidia, 10 mM dinatriumvetyfosfaattia (pH 7,0), 0,5 % SDS ja 100 µm/ml denaturoitua lohen sperma-DNA:ta.

Hybridisointi suoritettiin sitten suodattimella yön yli lämpötilassa 42°C, joka sisälsi ³²P-merkittyä koetinta, 5 x SSCP, 1 x Denhardt-liuosta, 50 % formamidia, 10 mM dinatriumvetyfosfaattia (pH 7,0), 0,1 % SDS ja 100 µm/ml denaturoitua lohen sperma-DNA:ta. Seuraavana

5 päivänä suodatin pestiin ensin yhden tunnin ajan lämpötilassa 37°C liuoksessa, joka sisälsi 50 % formamidia, 5 x SSC ja 0,1 % SDS, pestiin sitten kaksi tunti samassa lämpötilassa liuoksessa, joka sisälsi 40 % formamidia, 5 x SSC ja 0,1 % SDS, ja lopuksi pestiin huoneenlämmössä 15 min. 2 x SSC-liuoksella. Sen jälkeinen autoradiografia näytti, että

10 pcD-31-kloonin cDNA-insertti ei ole täyspitkä ja että vastaavan mRNA:n kokonaispituus on 3,9 kb (määritelty kalibrointikäyrästä, joka perustuu molekyylipainomerkitsijöihin).

Esimerkki 6

15

Tuoreen kirjaston valmistaminen seulovalle pcD-31 cDNA-kloonille

Tuore cDNA-kirjasto valmistettiin käyttämällä cDNA Synthesis System Plus:aa ja cDNA-kloonaujärjestelmää (λgt10, adapterimenetelmä, toimitaja Amersham).

20

5 µg poly(A)⁺ RNA:ta, jota on uutettu KM-102-soluista (käyttämällä samanlaista menetelmää kuin esimerkissa 1) ja 100 yksikköä käänteis-transkriptaasia annettiin reagoida lämpötilassa 42°C 40 min. 50 µl:ssa

25 käänteis-transkriptaasin reaktioliuosta. Tämän jälkeen 20 µCi [α -³²P] dCTP, 93,5 µl toisen säikeen puskuria, 4 yksikköä ribonukleesia H ja 115 yksikköä DNA-polymeraasia I (kaikki varustettu kitillä) lisättiin reaktioliuokseen, jota sitten ensin inkuboitiin lämpötilassa 12°C yhden tunnin, sitten haudottiin lämpötilassa 22°C yhden tunnin ja lopuksi kuumennettiin lämpötilassa 70°C 10 min. Tämän kuumentamiskäsittelyn

30 jälkeen 10 yksikköä T4 DNA-polymeraasia (varustettu kitillä) lisättiin reaktioliuokseen ja annettiin reagoida lämpötilassa 37°C 10 min.

Reaktioseokselle tehtiin sitten fenolikloroformi-deproteinisointi.

35 Reaktioliuos sentrifugoitiin ja kelluva osuus kerättiin ja sekoitettiin

250 μ l:n 4M ammoniumasetaatin ja 1 ml:n etanolin kanssa. Seosta jäädytettiin yön yli lämpötilassa -20°C ja saostuma kerättiin sentrifugoinnilla. Tuloksena saatu pelletti liuotettiin 30 μ l:aan steriiliä vettä. 10 μ l tuloksena saatua liuosta poistettiin ja lisättiin seokseen, joka sisälsi 2 μ l ligaasi/kinaasi-puskuria, 250 pmoolia EcoRI-adapteria ja 5 yksikköä T4 DNA -ligaasia (kaikki varustettu kitillä) ja tuloksena saatua seosta haudottiin yön yli lämpötilassa 15°C .

Koko reaktioliuokselle tehtiin sitten kokofraktiointikolonni, joka oli varustettu kitillä EcoRI-adapterin poistamiseksi. Reaktioliuos kerättiin 120 μ l:n alimääriin ja jokainen alimäärä sekoitettiin 200 μ m:n 0,25 x TE-puskurin kanssa. 10. - 17. fraktiot kerättiin ja väkevöitiin butanolilla kokonaistilavuuteen 120 μ l.

Koko väkevä valmiste sekoitettiin sitten 55 μ l:n steriilin veden kanssa, 20 μ l:n ligaasi/kinaasi-puskurin ja 40 yksikön T-polynukleotidikiinaasin kanssa (kaikki varustettu kitillä) ja tuloksena saatua seosta haudottiin lämpötilassa 37°C 30 min. Tämän jälkeen reaktioseos deproteinoitiin fenolikloroformimenetelmällä kolme kertaa ja sitten saostettiin etanolilla ja jäädytettiin yön yli lämpötilassa -20°C . Tuloksena saatu saostuma kerättiin sentrifugoinnilla ja liuotettiin 10 μ l:aan steriiliä vettä cDNA-näytteen saamiseksi.

1 μ g λ gt10:n EcoRI-armia, 1 μ l ligaasi/kinaasi-puskuria ja 2,5 yksikköä T4 DNA-ligaasia (kaikki kitillä) lisättiin 2 μ l:aan cDNA-näytettä, ja sen jälkeen haudottiin yön yli lämpötilassa 15°C . Näyte, joka sisälsi 4 μ l cDNA-näytettä valmistettiin samalla tavalla. Kutakin näytettä käsiteltiin sitten vielä seuraavalla tavalla. Tuloksena saatu reaktioliuos kokonaisuudessaan lisättiin ensin 10 μ l:aan uutetta A (varustettu kitillä) ja tuloksena saatu seos lisättiin 15 μ l:aan uutetta B (varustettu kitillä) ja tuloksena saatua seosta haudottiin lämpötilassa 20°C 20 min. in vitro-pakkausreaktion sallimiseksi.

Tämän jälkeen 470 μ l SM-puskuria lisättiin reaktioliuokseen, jota sitten varastoitiin lämpötilassa 4°C . E. colin kanta NM415, joka oli käsi-

telty 10 mM:lla MgSO_4 :ää, tartutettiin sitten varastoidulla liuoksella KM-102 cDNA:n $\lambda\text{gt}10$ -kirjaston luomiseksi.

Esimerkki 7

5

cDNA-kirjaston seulominen

2 x 10^5 plakkeja, jotka on saatu yhdistetyistä cDNA-kirjastoista, jotka on valmistettu esimerkissä 6, kiinnitettiin nailonsuodattimiin
10 (Hybond N, Amersham) seuraavalla menetelmällä.

Tartutettua E. colia, joka on valmistettu esimerkissä 6, viljeltiin kymmeneen 9 cm:n levyyn, jotka sisälsivät kiinteätä LB-väliainetta niin, että muodostui 1-2 x 10^4 plakkia per levy. Plakit siirrettiin
15 levyille kevyesti puristamalla nailonsuodatinta levyille. 18G-ruisku-neulaa käytettiin sitten suodattimen lävistämiseksi ja se merkitsi geelin kolmeen paikkaan. Suodattimen annettiin sitten seistä lämpötilassa 4°C 5-10 min. ja kuorittiin sitten ja upotettiin alkaliiniliuokseen (0,1 M NaOH, 1,5 M NaCl) 20 sekuntia. Suodatin siirrettiin
20 neutraalille liuokselle [0,2 M Tris-HCl (pH 7,5), 2 x SSCP] 20 sekunnin - yhden minuutin ajan ja ilmakeivattiin sitten huoneenlämpötilassa kaksi tuntia. Lopuksi suodatin kuivattiin lämpötilassa 80°C 2 tuntia.

Esimerkki 8

25

Koettimen valmistus ja hybridisointi

^{32}P -merkittyjä koettimia kehitettiin pcD-31:stä (saatu esimerkissä 1) merkitsemällä PstI-AatI-fragmentti ja EcoT221-AatI-fragmentti (223 bp)
30 pcD-31:stä käyttämällä Multiprime DNA -merkintäjärjestelmää. Plakin hybridisointi suoritettiin esimerkillä 7 saadulla suodattimella käyttämällä edellä olevia koettimia.

Esihybridisointi suoritettiin asettamalla suodatin hauteeseen, joka
35 sisälsi 50 % formamidia, 5 x SSCP, 2,5 x Denhardt-liuosta, 0,01 mM

dinatriumvetyfosfaattia (pH 7,0), 0,5 % SDS ja 100 μ m/ml denaturoitua lohen sperma-DNA:ta ja hautomolla lämpötilassa 37°C 2 tuntia.

- Hybridisointi suoritettiin sitten asettamalla suodatin reaktioliuokseen, joka sisälsi 32 P-merkittyjä koettimia, jotka on valmistettu edellä ja 50 % formamidia, 5 x SSCP, 1 x Denhardt-liuosta, 0,01 M dinatriumvetyfosfaattia (pH 7,0), 0,1 % SDS ja 100 μ m/ml denaturoitua lohen sperma-DNA:ta ja hautomalla yön yli lämpötilassa 37°C.
- 10 Seuraavana päivänä suodatin pestiin ensin huoneenlämmössä kolme tuntia liuoksella, joka sisältää 50 % formamidia, 5 x SSC ja 0,1 % SDS, ja sitten pestiin huoneenlämmössä 5 min. kaksi kertaa SSC:llä. Autoradiografia näytti 80 positiivista kloonia, jotka on saatu tällä primeerisellä seulalla.
- 15 Käyttämällä klooneja, jotka on tunnistettu positiivisiksi joka kerta, esimerkkien 7 ja 8 menetelmät toistettiin vielä kolme kertaa (kvaternäärinen seulonta) ja yhteensä 17 positiivista kloonia saatiin lopuksi. cDNA eristettiin jokaisesta 17 kloonista ja insertit leikattiin pois
- 20 EcoRI:lla. Jokaisen cDNA-insertin pituus tutkittiin agarosigeeli-sähköforeesilla ja kloonin nro 31-7 eristettiin, jolla oli 3,9 kbp:n cDNA-insertti, joka vastaa alkuperäisen mRNA:n täydellistä pituutta.

Esimerkki 9

25

Kloonin nro 31-7 restriktiokartoitus

- Kloonin nro 31-7 merkittiin EcoRI:lla 3,9 kb fragmentin eristämiseksi ja puhdistamiseksi, joka sisältää cDNA-insertin. Tämä fragmentti sisällytettiin sitten pUC18:aan käyttämällä T4 DNA -ligaasia. E. coli DH5 α siirrettiin tällä uudella plasmidilla. Transformoidut solut valittiin niiden resistanssin mukaan ampisiliinia vastaan ja kloonin pUCKM31-7, jolla on 3,9 kbp cDNA-insertti, tunnistettiin merkitsemällä DNA EcoRI:lla ja tekemällä halkaistulle DNA:lle agarosigeeli-sähköforeesi.

35

- pUCKM-31-7 halkaistiin kullakin seuraavilla restriktioentsyymillä HindIII, SacI, XbaI, SmaI, BgIII, EcoT22I ja AatI tai niiden pareilla. Agarosoosigeeli-sähköforeesi suoritettiin tuloksena saaduilla fragmenteilla ja kunkin fragmentin pituus mitattiin käyttämällä λ HindIII/
- 5 AX174HaeIII -merkitsijää indikaattorina. Tuloksena saatu restriktio-kartta on esitetty kuviossa 7.

Esimerkki 10

10 Kloonin nro 31-7 sekvenssin määrittäminen

- pUCKM-31-7:n cDNA-insertin koko nukleotidisekvenssi määritettiin dideoksimenetelmällä käyttämällä M13-fagia. Lisäksi osa sekvenssistä analysoitiin 373A DNA -sekvenssoijalla (Perkin-Elmer Japan Applied
- 15 Biosystems). Tuloksena saatu nukleotidisekvenssi on ID nro 11 oheisessa sekvenssilistauksessa.

- pUCKM-31-7:n cDNA-inertti on 3815 emästä pitkä ja selvästi sillä on avoin lukukehys, joka koostuu 549 aminohaposta alkaen metioniinista.
- 20 Poly(A)-loppua ei ilmeisesti ole. pcD-31:n insertin 3'-päätteen emäsekvenssin vertailu kloonin pUCKM31-7 sekvenssiin antaa ymmärtää, että pUCKM-31-7 insertistä ainoastaan puuttuu poly(A)-loppuosa (kuvio 8) eikä mitään muuta.
- 25 EMBL- ja geenipankkinukleotiditietokannat ja NBRF- ja SWISS-PROT -tietokannat tehtiin, jotta voitaisiin vertailla emästä ja aminohapposekvenssejä. Lähin vastaavuus mikä löydettiin oli, että peptidisekvenssillä oli 35,3 %:n homologia ihmisen glutathionireduktaasin kanssa. Siksi vedettiin se johtopäätös, että pUCKM-31-7:n cDNA-insertin ORF
- 30 selvästi koodaa uutta polypeptidiä. Tämä uusi polypeptidi on esitetty sekvenssinä ID numero 12 oheisessa sekvenssilistauksessa.

Esimerkki 11Uuden polypeptidin ilmaisu ja puhdistus

- 5 Korkean ilmaisuuden vektorin rakentaminen ja ilmaisu COS-1-soluissa

pUCKM-31-7 merkittiin HindIII:lla ja 3003 bp fragmentilla, joka sisälsi cDNA-insertin, ja eristettiin ja puhdistettiin seuraavilla standardimenetelmillä. Tuloksena saadun fragmentin päätteet liitettiin käyttämällä DNA-tartuntakittiä (Takara Shuzo).

Sillä aikaa korkean ilmaisuuden vektori pcDL-SR α 296 [Takabe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 466-472] merkittiin PstI:llä ja KpnI:llä ja päätteet yhdistettiin käyttämällä DNA-tartuntakittiä. Yhdistetty insertti sidottiin sitten yhdistettyyn plasmidiin reaktiossa, jossa käytettiin T4 DNA -ligaa-

- 15 sia. E. coli siirrettiin sitten tuloksena saadulla DNA:lla kalsiumkloridimenetelmällä ja tuloksena saadut Amp^R-siirränäiset valittiin ja plasmidi DNA, joka pidettiin organismeilla, analysoitiin.
- 20 Erityisesti kanta, jossa cDNA transkription suuntaus oli identtinen SR α -promoottorin suunnan kanssa, valittiin merkitsemällä plasmidi HindIII:lla ja BglII:lla ja sen jälkeen agarosigeli-sähköforeesilla 800 bp fragmentin paikallistamiseksi ja plasmidi, joka valittiin, merkittiin pSR α 31-7 (kuvio 9). SR α -promoottori käsittää SV40 alkupromoot-
- 25 torin ja pitkän päätetoiston (LTR) HTLV-1:n R-U5 sekvenssin ja sen promoottoriaktiivisuus on 10 - 100 kertaa vahvempi kuin pelkän SV40 alkupromoottorin.

Seuraavaksi COS-1-soluja tartutettiin tuloksena saadulla plasmidilla pSR α 31-7. COS-1-solujen transfektio suoritettiin sähköporaatiolla käyttämällä GTE-1-geenisisälytyslaitetta (Shimazu).

- COS-1-solujen annettiin kasvaa puoliyhtenäisiksi 150 cm³ pullojen pohjilla, jokaisen sisältäessä 25 ml DMEM (sisältäen 10 % härän sikiöserumia). Viljelmät kerättiin sitten ja jokaista käsiteltiin 3 ml:lla

trypsiini-EDTA-liuosta (10 x liuosta, joka on saatavissa Sigmassa) ja annettiin seistä huoneenlämmössä, kunnes solut oli erotettu. 1 ml inaktivoitua härän sikiöseerumia ja 9 ml tuoretta trypsiini-EDTA-liuosta lisättiin sitten ja solut kerättiin sentrifugoinnilla. Kerätyt solut
5 pestiin sitten kaksi kertaa PBS(-) -puskurilla ja suspensoitiin PBS(-) -puskurin tiheyteen 6×10^7 soluja/ml.

Sillä aikaa plasmidi DNA valmistettiin cesiumkloridimenetelmällä ja laimennettiin 200 $\mu\text{g/ml}$:ksi PBS(-) -puskurissa.

10

20 μl jokaista edellä mainittua PBS(-) soluvalmistetta ja plasmidia sekoitettiin ja tuloksena saatu seos sijoitettiin kammioon, joka sisälsi elektrodeja, jotka oli 2 mm:n etäisyydellä toisistaan. Kaksi 600 V pulssia, joista kumpikin kesti 30 μsek kohdistettiin sitten seokseen
15 yhden sekunnin välein.

Elektrodikammio jäähdytettiin lämpötilassa 4°C 5 min. ja sitten sisäpuolella oleva solu-DNA-seos sekoitettiin 10 ml:n DMEM kanssa sisältäen 10 % härän sikiöseerumia. Tämä seos siirrettiin Petri-levylle ja viljeltiin yön yli lämpötilassa 37°C 5 %:ssa CO_2 -atmosfäärissä. Seuraavana päivänä viljelyn kelluva osuus erotettiin, solut pestiin seerumivapaalla DMEM:llä ja sitten suspensoitiin 10 ml:aan DMEM ja viljeltiin lämpötilassa 37°C kolme päivää. Tämän jälkeen solun kelluva osuus haravoitiin.

25

Viljelyn kelluva osuus haravoitiin myös negatiivisesta kontrollista. Negatiivisessa kontrollissa käytettiin plasmidia pcDL-SR α 296, joka ei sisältänyt cDNA-inserttiä, mutta muuten valmistettiin samalla tavalla kuin testiviljely.

30

1 ml jokaista negatiivisen kontrollin viljelyn kelluvaa osuutta ja testiviljelmää käsiteltiin erikseen seuraavalla tavalla. Kelluva osuus käsiteltiin ensin trikloorietikkahapolla (TCA) proteiinin saostamiseksi ja saostuma kerättiin sentrifugierotuksella. Tuloksena saatu saostuma
35 pestiin jääkylmällä asetonilla ja ilmakeivattiin ja liuotettiin sitten

SDS-polyakryyliamidigeeli-sähköforeesin (SDS-PAGE) näytepuskuriin, joka sisälsi 2-merkaptoetanolia. SDS-PAGE suoritettiin sitten 12,5 %:n geelissä pelkistävässä olosuhteissa.

- 5 Hopeavärjäys käyttämällä hopeavärireagenssia "Daiichi" (Daiichi Chemical Detection) suoritettiin alueille sähköforeesin jälkeen. Useita erityisiä spesifisiä absorptioalueita (molekyylipaino: noin 60.000) testinäytteen viljelyn kelluvasta osuudesta värjättiin.
- 10 Koska polypeptidin molekyylipaino, joka on koodattu pSR α 31-7:ssä, on noin 60.000 ja koska aminohapposekvenssistä todettiin, että translaation jälkeinen modifiointi sakkaridisivuketjujen lisäämiseksi oli epätodennäköistä, vedettiin se johtopäätös, että nämä monta erityistä aluetta vastasi polypeptidiä, jota koodasi pSR α 31-7:n cDNA.

15

Esimerkki 12

Korkean ilmaisuuden plasmidin valmistus COS-1-soluja varten

- 20 Seuraava vaihe tehtiin sen varmistamiseksi, että useat erityiset 60 kDa:n alueet, jotka on tunnistettu esimerkissä 11, ovat samat kuin polypeptidi, jota pSR α 31-7-insertti koodaa. Haluttiin myös määrittää tämän polypeptidin N-pääte aminohapposekvenssi. Siten klooni valmistettiin, jossa ylimääräistä kuutta His-jäännöstä koodattiin polypeptidin C-päätettä varten, jota koodaa pSR α 31-7-insertti, välittömästi
- 25 ennen pysäytyskodonia. Histidiinijäännöksillä on korkea affiniteetti Ni^{2+} nähden ja tarkoitus oli ilmaista polypeptidi, jolla on histidiiniheksomeeri (6 x His), joka voitaisiin puhdistaa käyttämällä affiniteettihartsikolonnia, joka on ladattu Ni^{2+} :lla.

30

Ensin 66 emäksen oligonukleotidi

5'-CTAGCGCTCTGGGGCAAGCATCCTCCAGGCTGGCTGCCACCACCACC

ACCACCACTGATCTAGACT-3' (sekvenssi ID nro 14)

ja täydentävä 66 emäksen säe syntetisoitiin ja puhdistettiin käyttämäl-

- 35 lä automatisoitua DNA-syntetisaattoria 394 (Perkin-Elmer Japan Applied

Biosystems). Molemmat oligonukleotidivalmisteet sekoitettiin ja haudotettiin lämpötilassa 70°C 3 min. ja sitten lämmitettiin lisää lämpötilassa 37°C 30 min. sidoksen sallimiseksi. Sen jälkeen päätteet fosforyloitiin käyttämällä T4-polynukleotidikinaasia.

5

Tuloksena saatu kaksisäikeinen (ds) fragmentti sidottiin käyttämällä T4 DNA -ligaasia pUCKM31-7:ään, joka oli aikaisemmin merkitty Eco47III:lla. Rakenne on esitetty kuviossa 10. E. coli DH5 α siirrettiin tällä DNA:lla kalsiumkloridimenetelmällä ja tuloksena saadut siirretyt säikeet valittiin ja seulottiin pUCKM31-7His:n saamiseksi. Varmistettiin, että ei ollut mitään epänormaalisuuksia pUCKM31-7His-osassa, jossa fragmentti sisällytettiin analysoimalla tämän pUCKM31-7His:n kyseenomaisen emäsekvenssin osaa.

15 Korkean ilmaisen plasmidi COS-1-soluja varten valmistettiin sitten alkloonamalla pUCKM31-7His-insertti pcDL-SR α 296:een.

pUCKM31-7His merkittiin XbaI:llä ja HindIII:lla, fragmentit puhdistettiin ja fragmentin päätteet yhdistettiin käyttämällä Klenow-fragmentin 20 1 yksikköä seuraavien läsnäollessa: 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2mM dGTP, 2 mM dTTP, 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 0,1 mM ditiotreitolia ja 50 μ g/m BSA).

Sillä aikaa korkean ilmaisen vektori pcDL-SR α 296 merkittiin PstI:llä ja 25 KpnI:llä ja päätettiin DNA tartuntakitillä. Yhdistetty fragmentti sidottiin sitten yhdistettyyn plasmidiin käyttämällä T4 DNA -ligaasia. Tuloksena saatua plasmidia käytettiin sitten E. coli DH5 α :n siirtämiseksi. Transformantit valittiin ja seulottiin sitten. Kanta, jossa cDNA-transkription suunta oli sama kuin SR α -promoottorin suunta, valittiin ja tämän kannan plasmidi merkittiin pSR α 31-7His. COS-1-soluja 30 tartutettiin tuloksena saadulla plasmidilla pSR α 31-7His ja seerumivapaata kelluvaa osuutta saatiin samalla tavalla kuin on kuvattu esimerkissä 11.

35

Esimerkki 13Puhdistus ja N-päätteisen aminohapposekvenssin analyysi

- 5 600 ml:lle kelluvaa ainetta, joka on saatu esimerkissä 12, tehtiin dialyysi dialyysipuskurin 17 tilavuutta vastaan lämpötilassa 4°C 15 tuntia. Puskuri korvattiin vielä dialyysipuskurin 17 tilavuudella ja dialyysia jatkettiin lämpötilassa 4°C vielä 4 tuntia.
- 10 Dialyysivalmisteelle tehtiin sitten affiniteettikromatografia käyttämällä FPLC (Fast Protein Polynucleotide Liquid Chromatography - Pharmacia) seuraavissa olosuhteissa:

Kolonne: 20 ml ProBond™-hartsia (Invitrogen), joka oli täytetty

- 15 XK16/20:llä (Φ 2,0 20 cm, Pharmacia)

Eluointipuskuri:

- A) 20 mM fosfaattipuskuria (pH 7,8), joka sisälsi 200 mM imidatsolia, 0,5 M NaCl
- 20 B) 20 mM fosfaattipuskuria (pH 7,8), joka sisälsi 300 mM imidatsolia, 0,5 M NaCl

Virtausnopeus: 1 ml/min.

- 25 Fraktioliuos: 5 ml/putki

Eluointiolosuhteet:

- Kun oli otettu talteen 4 fraktiota eluointipuskurilla A), 16 fraktiota otettiin talteen eluointipuskurilla B), ja
- 30 fraktiot numeroitiin järjestyksessä 1-20.

- 300 µl kutakin tuloksena saatua fraktionäytettä otettiin ja käsiteltiin erikseen TCA-saostumakäsittelyllä ja tuloksena saatu saostuma valmistettiin ja sille tehtiin SDS-PAGE käyttämällä 12,5 % geeliä pelkistävissä olosuhteissa kuten edellä. Alueet tunnistettiin hopeavärimenetelmällä ja kolme aluetta tunnistettiin ja ne olivat fraktion nro 10 ympärillä. Kolmen alueen olemassaolo osoittaa, että pSRα31-7His-insertti
- 35

koodaa polypeptidiä, jolla on kolme erilaista pituutta ja erilaista N-päätesekvenssiä.

Jäljellä olevat fraktiot 7-14 keskitettiin TCA-saostumalla ja saostu-
 5 malle tehtiin SDS-PAGE käyttämällä 10 % geeliä pelkistävässä olosuh-
 teissa. Proteiiniainekset siirrettiin sitten polyakryyliamidigeelistä
 polyvinyylidiini-difluoridi (PVDF) kalvolle (ProBlot™, Applied Bio-
 systems) käyttämällä geelimembraani-siirtolaitetta (Marisol, KS-8441),
 joka kävi 9 V:lla siirtopuskurin läsnäollessa [0,02 % SDS, 20 % metano-
 10 lia, 25 mM tris-boraattia (pH 9,5)] lämpötilassa 4°C 2,5 tuntia.

Tämän jälkeen kalvo värjättiin 0,2 % naftolisinimustalla (Sigma) ja
 kolme aluetta, jotka vastasivat niitä, jotka aikaisemmin tunnistettiin,
 otettiin kalvosta ja jokaisen alueen sekvenssi määriteltiin kuudenteen
 15 aminohappoon asti N-päätteestä käyttämällä kaasufaasiproteiinisekvens-
 soijaa (Shimadzu, PPSQ-10). Alueen N-pääte toiseksi suurimmalla näen-
 näisellä molekyylipainolla (molekyylipaino 60.000) oli seuraava:

Val-Val-Phe-Val-Lys-Gln (sekvenssin ID nro 12 aminohappo nrot 1-6)
 20

Nämä kuusi aminohappoa vastasivat ORF:n ensimmäistä kuutta aminohappoa
 kloonista 31-7 ja ne myös vastasivat kuuden aminohapon sekvenssiä, joka
 alkoi 24. aminohaposta (Val) edeltäjäpolypeptidin N-päätteestä, jota
 koodaa pSR α 31-7His ja pSR α 31-7 cDNA-insertit. Siksi aminohaponumeroi-
 25 den 1-23 poistaminen tämän edeltäjäpolypeptidin N-päätteestä johtaisi
 proteiinin luonnollisen muodon erittämiseen alkaen Val-jäännöksestä.

Esimerkki 14

30 Pelkistävän vaikutuksen määrittäminen

i) Ilmaisuvektorin rakentaminen

Polypeptidi, joka on puhdistettu edellisissä esimerkeissä, saatiin
 35 ainoastaan erittäin pienissä määrissä ja se ilmaistiin COS-1-soluista.
 Siksi ei ollut mahdollista käyttää polypeptidiä muihin tarkoituksiin
 kuten aktiivisuusanalyysiin. Siksi oli välttämätöntä löytää ilmaisu-

polypeptidi, jota koodasi pSR α 31-7:n cDNA-inserttiä vaihtoehtoisessa isännässä, joka salli sopivien määrien tuotannon puhdistukseen ja analyysiin. Tämän saavuttamiseksi suoritettiin seuraava menetelmä.

- 5 pUCKM31-7 merkittiin HindIII:llä ja 3003 bp fragmentti, joka sisälsi cDNA-insertin, eristettiin ja puhdistettiin ja päätteet yhdistettiin käyttämällä DNA-tartuntakittiä. Fragmentti merkittiin sitten vielä XbaI:llä.
- 10 Ilmaisuvektori pMAL-c [Guan, C. et al. (1987) Gene 67,21-30] merkittiin XbaI:llä ja StuI:llä ja sitten edellä oleva XbaI-modifioitu HindII-fragmentti sidottiin tähän halkaistuun plasmidiin käyttämällä T4 DNA-ligaasia. Tuloksena saatu rakenne on esitetty kuviossa 11. Rakennetta käytettiin sitten E. coli TB-1:n siirtämiseksi ja Amp^R-transformantit
- 15 valittiin ja seulottiin. Kanta, jossa cDNA-transkription suunta oli identtinen promoottorin suuntaan, valittiin ja näin saatu plasmidi merkittiin olevan pMAL31-7.

ii) Fuusioproteiinin ilmaisu ja puhdistus

20

E. colin siemenviljelmä, jossa oli pMAL31-7, valmistettiin ravistamalla yön yli lämpötilassa 37°C 3 ml:ssa LB-väliainetta, joka sisälsi 50 µg/ml ampisiliiniä. Seuraavana päivänä 1 ml siemenviljelmää lisättiin 100 ml:aan tuoretta LB-viljelyväliainetta, joka sisälsi 50 µg/ml

25 ampisiliiniä ja viljelyä ravistettiin lämpötilassa 37°C, kunnes OD_{600nm} saavutti arvon 0,5. Tässä vaiheessa IPTG lisättiin viljelmän lopulliseen konsentraatioon 0,1 mM, ja viljelyliettä viljeltiin lisää yön yli lämpötilassa 37°C.

- 30 Seuraavana päivänä bakteerisolut otettiin talteen yön yli viljelmästä sentrifugoimalla nopeudella 6500 rpm 20 min. lämpötilassa 4°C. Pelletti suspensoitiin 10 ml:aan kolonnipuskuria ja tuloksena saadussa suspensiossa olevat solut katkaistiin käsittelemällä ultraäänihajottimella. Kokosolut ja solufragmentit poistettiin sitten sentrifugoimalla nopeu-
- 35 della 8800 rpm 30 min. lämpötilassa 0°C ja liukeneva proteiinifraktio

otettiin talteen kelluvana osuutena. 1 ml:lle tätä liukenevaa fraktiota tehtiin sitten kromatografia amyloosihartsikolonnissa (New England Biolabs).

- 5 Kromatografian eluointipuskuri valmistettiin lisäämällä maltoosia 10 ml kolonnipuskurin 10 mM:n lopulliseen konsentraation.

Negatiivinen kontrollinäyte kromatografioitiin myös. Tämä negatiivinen kontrolli valmistettiin käyttämällä samanlaista menetelmää
10 paitsi, että pMAL-c-vektoria käytettiin ilman mitään cDNA-inserttiä. Proteiinin pelkistävää vaikutusta kromatografianäytteissä analysoitiin sitten.

iii) Pelkistävän vaikutuksen määrittäminen

15

Pelkistävän vaikutuksen määrittäminen suoritettiin kyvetissä (SARSTEDT, 10 x 4 x 45 mm) käyttämällä dikloorifenoli-indofenolia (DCIP) ja hapetettua glutathionia.

- 20 a) Pelkistävän vaikutuksen määrittäminen käyttämällä DCIP:tä

90,4 µg, määriteltynä käyttämällä proteiininanalyysikittiä (Bio-Rad), jokaista kromatografianäytettä, joka on saatu edellä kohdassa ii), sekoitettiin erikseen 1 ml:aan 50 µM DCIP (Sigma). 15 µl 1 mM NADPH
25 (Boehringer-Mannheim) lisättiin sitten kuhunkin näytteeseen ja OD_{600nm} ja OD_{340nm} absorbanssi-arvot tehtiin ajan mukaan. Tuloksena saatu absorbanssin väheneminen molemmissa aallonpituuksissa kuten on esitetty kuviossa 12 voidaan nähdä, että ainoastaan pMAL31-7-näyte sisältää tekijän, joka vähentää DCIP:tä.

30

b) Pelkistävän vaikutuksen määrittäminen käyttämällä glutathionia

15 ml 10 mM hapetettua glutathionia (Boehringer-Mannheim) lisättiin 90,4 µg:aan jokaista kromatografianäytettä, joka on saatu edellä kohdassa ii) ja joka oli aikaisemmin lisätty eri kyvetteihin. 15 µl 1 mM
35

NADPH:ta lisättiin jokaiseen kyvettiin ja absorbanssi OD_{340nm}:ssä otettiin ajalla. Tulokset on esitetty kuviossa 13 ja voidaan nähdä, että ainoastaan proteiini pMAL31-7 näytteestä kykenee pelkistämään hapetettua glutationia. Havaittiin myös, että mitään NADPH-kulutusta ei ole,
 5 kun hapetettua glutationia on läsnä, joten vedettiin se johtopäätös, että proteiini pMAL31-7 näytteestä ainoastaan voi pelkistää hapetettua glutationia NADPH:n läsnäollessa.

Esimerkki 15

10

N-pääte aminohapposekvenssin puhdistus ja analyysi

Esimerkistä 13 vedettiin se johtopäätös, että COS-1-solut, jotka oli tartutettu pSR α 31-7His:llä, ilmaisivat polypeptidiä, jolla on kolmen-
 15 tyypisiä N-päätteitä.

Erillisessä kokeessa kanit immunisoitiin fuusioproteiinilla, joka on otettu talteen E. colista, joka on transformoitu pMAL31-7:llä polyklonaalisen vasta-aineen saamiseksi KM31-7 proteiinia vastaan.

20 Westernblottaus suoritettiin käyttämällä tätä polyklonaalista vastaainetta ja oli selvää, että kolmentyyppistä aluetta myös on tunnistettu seerumivapaassa viljelyn kelluvassa osuudessa, joka on saatu COS-1-soluista, jotka on tartutettu pSR α 31-7:llä. Tämä tulos on samanlainen kuin se, joka on saatu esimerkissä 13.

25

Siten COS-1-solut tartutettiin pSR α 31-7:llä, jotta voitaisiin kerätä suuri tilavuus seerumivapaata viljelyn kelluvaa osuutta ja puhdistaa KM31-7-proteiinin N-päätsekvenssi ja analysoida.

30 COS-1-solut tartutettiin pSR α 31-7:llä ja viljeltiin kolme päivää 150 mm:n petrilevyillä jokaisen sisältäessä 30 ml DMEM. Viljelyn kelluvaa osuutta kerättiin tämän jälkeen ja 30 ml tuoretta väliainetta lisättiin jokaiseen levyyn ja viljelyä jatkettiin vielä kolme päivää. Jälleen kerran viljelyn kelluva osuus kerättiin. Muut tartunnan muodot

ja viljelmä oli kuten on kuvattu esimerkissä 11, mutta 199 levyä viljeltiin.

Kerätyt kelluvat osuudet yhdistettiin ja 10 l seerumivapaata viljelyn
5 kelluvaa osuutta kerättiin sentrifugoinnin jälkeen ja tämä dialysoitiin yön yli 10 mM Tris-HCl vastaan (pH 9,0). Ioninvaihtokromatografia suoritettiin sitten 8 kertaa dialysoidulla valmisteella seuraavissa olosuhteissa käyttämällä FPLC (Pharmacia):

10 Kolonni: 20 ml DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia) täytettiin XK16/20:een (Φ 2,0 x 20 cm), Pharmacia)

Eluointipuskurit:

A) 10 mM Tris-HCl (pH 0,9)
15 B) 10 mM Tris-HCl (pH 0,9) - 0,5 M NaCl

Virtausnopeus: 1 ml/min.

Fraktioliuos: 3 ml/putki

20

Eluointiolosuhteet:

Eluointipuskuri A), joka vaihdettiin eluointipuskuriksi B) lineaarisella konsentraatiogradientilla 60 min. ajan.

25 Fraktiot, jotka eluointiin jokaisella NaCl-konsentraatiolla 0,1 M:stä 0,4 M:ään kerättiin ja yhdistettiin ja dialysoitiin yön yli dialysointipuskuria vastaan, joka sisälsi 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,6) ja 1 mM 2-merkaptetanolia. Dialysoidulle valmisteelle tehtiin sitten affiniteettikromatografia käyttämällä 2',5'-ADP Sepharose 4B:tä
30 (Pharmacia) seuraavissa olosuhteissa:

Kolonni: 20 ml 2',5'-ADP Sepharose 4B:tä täytettiin XK16/20:een (Φ 2,0 x 20 cm), Pharmacia)

35

Eluointipuskurit:

A) 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,6)

1 mM 2-merkaptoetanolia

B) 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,6)

5 1 mM 2-merkaptoetanolia, 10 mM NADPH

Virtausnopeus: 0,5 ml/min.

Fraktioliuos: 2 ml/putki

10

Eluointiolosuhteet:

Eluointipuskuri A), joka vaihdettiin eluointipuskuriksi B) lineaarisella konsentraatiogradientilla 120 min. ajan.

15 100 μ l:n jokaisen tuloksena saadun fraktion alimääriä saostettiin TCA:-lla ja saostumille tehtiin SDS-PAGE käyttämällä 12,5 % geeliä pelkistävissä olosuhteissa.

20 Sähköforeesin jälkeen geeli hopeavärjättiin proteiinialueiden tunnistamiseksi. Kolme aluetta saatiin alkaen fraktiosta #11.

Koko jäljellä olevat fraktiot #11 - #14 väkevöitiin sitten TCA-saostumisella ja saostumalle tehtiin SDS-PAGE käyttämällä 12,5 % geeliä pelkistävissä olosuhteissa. Proteiini siirrettiin sitten geelistä ProBlot

25 PVDF-membraanille (Applied Biosystems) sähköforeesin jälkeen. Proteiinin vaihdon jälkeen membraanille, membraani värjättiin 0,2 %:lla naftolisinimustalla ja kolme proteiinipitoista aluetta tehtiin. N-päätesekvenssianalyysi suoritettiin sitten käyttämällä kaasufaasiproteiinisekvenssoijaa.

30

Alueiden N-päätteellä, jolla ilmeisesti on pienin molekyylipaino kolmesta tyypistä, määritettiin olevan Lys-Leu-Leu-Lys-Met. Nämä viisi aminohappoa vastaavat viittä aminohappoa, jotka alkavat polypeptidin N-päätteen 49. aminohaposta, jota koodaa pSR α 31-7 cDNA-insertti. Siten

vedettiin se johtopäätös, että peptidin halkaisu 48. jäännöksen kohdalla johti erääseen proteiinin kypsään muotoon, joka alkoi N-pääte Lys:stä.

5 Esimerkki 16

Monoklonaalisen vasta-aineen valmistus KM31-7 proteiinia vastaan

(a) Antigeeniproteiinin valmistus

10

E. colin siemenviljely pMAL31-7 valmistettiin viljelemällä solusilmukkaa ravistamalla yön yli lämpötilassa 37°C 3 ml:ssa LB-väliainetta, joka sisälsi 50 µg/ml ampisiliiniä. 1 ml tuloksena saatua siemenviljelmää sisällytettiin 100 ml:aan tuoretta LB-väliainetta, joka sisälsi

15 50 µg/ml ampisiliiniä ja tätä viljeltiin ravistamalla lämpötilassa 37°C, kunnes OD_{600nm} saavutti arvon 0,5. Tässä vaiheessa IPTG lisättiin viljelyliemen lopulliseen konsentraatioon 0,1 mM, jota sitten vielä viljeltiin ravistamalla yön yli lämpötilassa 37°C.

20 Soluja otettiin talteen tuloksena saadusta yön yli viljelystä sentrifugoimalla nopeudella 6500 rpm 20 min. lämpötilassa 4°C ja pelletti suspensoitiin 10 ml:ssa kolonnipuskuria. Tuloksena saadussa suspensiossa olevat solut katkaistiin käyttämällä ultraäänihajotinta ja tuloksena saatu neste sentrifugoitiin nopeudella 8000 rpm lämpötilassa 0°C 30 min.

25 Tuloksena saatu kelluva osuus sisälsi liukenevan proteiinifraktion.

Tälle liukenevalle proteiinifraktiolle tehtiin kromatografia 1 ml:lla amyloosihartsikolonnia. Eluointi suoritettiin 10 ml:lla kolonnipuskuria, joka sisälsi 10 mM maltoosia. Kromatografiasta saatu yhdistelmä-
30 proteiini varastointiin ja käytettiin sen jälkeen antigeenina.

(b) Immunisoitujen hiirten pernasolujen valmistus

2 ml Freundin täydellistä apuainetta lisättiin 2 ml:aan antigeenia
35 (vastasi 200 µg) puhdistettu kohdassa a) edellä emulsion muodostamiseksi-

si. Tämä emulsio otettiin 5 ml:n ruiskuastiaan, joka oli varustettu lasiliittimellä ja emulsiota käytettiin immunoisoimaan 8 viikon ikäisiä BALB/c-uroshiiriä ihonalaisella ruiskulla.

- 5 Lähtien immunisaation toisesta kierroksesta Freundin epätäydellistä apuainetta käytettiin apuaineena, mutta suorittamalla sama menetelmä kuin ensimmäisessä immunoisoinnissa. Immunoisointi suoritettiin neljä kertaa yhteensä nopeudella karkeasti ottaen yksi immunoisointi per kaksi viikkoa.

10

Toisesta immunoisoinnista lähtien verikokeita otettiin silmän pohjan laskimopunoksesta välittömästi ennen immunoisointia, ja anti-KM31-7 vasta-aineen titteri seerumissa määritettiin kiinteän faasin entsyymisidonnaisella immunosorbenttianalyysillä (ELISA).

15

Kiinteä faasi anti-KM31-7 ELISA

- 150-200 μ l (vastasi noin 200 ng yhdistelmäproteiinia) seerumivapaata viljelyn kelluvaa osuutta, jotka oli saatu COS-1-soluista, jotka oli
20 tartutettu pSR α 31-7:llä, asetettiin jokaisen 96 reiän ELISA-levyn reikään (Costar) käytettäväksi antigeeninä. Levyn annettiin sitten seistä yön yli lämpötilassa 37°C levyn reikien pohjapinnan päällystämiseksi. Seuraavana päivänä levy pestiin kolme kertaa 0,1 % Tween 20/fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (0,1 % Tween 20/PBS) ja sitten jokaiseen
25 reikään laitettiin 100 μ l BSA:ta, joka oli valmistettu 10 μ g/ml PBS ja annettiin seistä huoneenlämmössä yksi tunti.

- Tämän jälkeen levy pestiin vielä kolme kertaa 0,1 % Tween 20/PBS:llä. 30-100 μ l primeeristä vasta-ainetta sarjanomaisesti laimennetulla näy-
30 temuodolla (esim. hiiren seerumi, kelluva hydridomaviljely tai monoklonaalinen vasta-aine) lisättiin jokaiseen reikään ja levyn annettiin seistä huoneenlämmössä yksi tunti.

- Tämän jälkeen levy taas pestiin kolme kertaa 0,1 % Tween 20/PBS:llä ja
35 sitten 100 μ l sekundääristä vasta-ainetta lisättiin jokaiseen reikään.

Sekundäärinen vasta-aine valmistettiin 3000-kertaisella vuohen anti-hiiri IgG-peroksidaasi-kompleksiliuoksella (Amersham) 3000-kertaisella vuohen anti-hiiri IgG-alkaliinifosfotaasikompleksin laimennuksella (BIO-RAD). Levyn annettiin sitten seistä huoneen lämmössä 1-2
5 tuntia.

Tämän jälkeen levy taas pestiin kolme kertaa 0,1 % Tween 20/PBS:llä, ja sitten 100 μ l:lla joko peroksidaasin substraattiliuosta (BIO-RAD, peroksidaasisubstraattikitti ABTS) tai 10 % dietanoliamiinilla, joka
10 sisälsi 0,001 % paranitrofenyylifosfaattiliuosta, lisättiin jokaiseen reikään. Levyn annettiin sitten seistä huoneenlämmössä 15-30 min., jonka jälkeen vasta-ainetitteri voitiin laskea mittaamalla absorbanssia aallonpituuksissa 415 nm tai 405 nm käyttämällä mikrolevylukijaa (BIO-RAD).

15

(c) Hiiren myelomasolujen valmistus

8-atsaguaniini-vastustuskykyistä hiiren myelomasolua P3-X63-Ag8.653 (653) (ATTC nro CRL-1580) viljeltiin normaalissa väliaineessa (täydellinen GIT), jotta saatiin minimi 2×10^7 soluja.
20

(d) Hybridoman valmistus

$1,4 \times 10^8$ immunisoituja hiiren pernasoluja, jotka oli saatu immunisoinnista, joka on kuvattu edellä olevassa kohdassa b) pestiin perusteellisesti DMEM:llä (Nissui Pharmaceutical). Pestyt solut sekoitettiin sitten $1,5 \times 10^7$ hiiren myelomasoluihin P3-X63-Ag8.653 (653), jotka oli valmistettu edellä olevassa kohdassa (C) ja tuloksena saatu seos sentrifugoitiin nopeudella 800 rpm 6 min.
25

30

Soluryhmä, joka koostui pernasolujen ja P3-X63-Ag8.653 (653) -solujen seoksesta, kerättiin pellettinä ja hajoitettiin. Polyetyleeniglykolia 4000 (polyetyleeniglykoli 4000) 50 %:sena liuoksena DMEM:n kanssa valmistettiin etukäteen ja tämä liuos kaadettiin hajotettuihin soluihin
35 yhden minuutin ajan sekoittamalla nopeudella 2 ml/min. DMEM lisättiin

soluvalmisteeseen samalla tavalla yhden minuutin ajan nopeudella 2 ml/min. Tämä menetelmä toistettiin kerran vielä sekä polyetyleeniglykolin että DMEM-liuosten kanssa. Lopuksi 16 ml DMEM lisättiin vähitellen 6 min. ajan. Tuloksena saatu solun valmiste sentrifugoitiin nopeudella 800 rpm 6 min. Tuloksena saatu kelluva osuus erotettiin ja solut suspensioitiin 35 ml:aan täydellistä GIT:iä, joka sisälsi 5-10 ng/ml hiiren IL-6.

(e) Hydridomien seulonta

10

100 μ l kohdassa d) valmistettua suspensiota lisättiin jokaiseen 96 reiän levyreikään (Sumitomo Bakelite), jota viljeltiin lämpötilassa 37°C 7,5 % CO₂-inkubaattorissa. 7 päivän hautomisen jälkeen 50 μ l HAT-väliainetta lisättiin jokaiseen reikään. Vielä neljän päivän hautomisen jälkeen toiset 50 μ l HAT-väliainetta lisättiin jokaiseen reikään. Levyä haudottiin kolme päivä vielä. Tämän jälkeen viljelyn kelluvasta osuudesta otettiin rei'istä, jossa yhdistyneiden solujen kasvuviljelelmä voitiin havaita ja anti-KM31-7 vasta-aineen titteri analysoitiin kiinteällä faasilla ELISA, joka on kuvattu kohdassa b) edellä. Otettu väliaine korvattiin heti HAT-väliaineella.

20

(f) Kloonaus

Solujen kloonaus rei'istä, jotka testissä olivat positiivisia, toistettiin kolme kertaa rajoittavalla liuotusanalyysillä. Ne kloonit, joilla havaittiin konsistentti-vasta-ainetitteri valittiin käytettäväksi anti-KM31-7 monoklonaalisina vasta-ainetta tuottavina hybridomasolulinjoina. Varsinkin tässä vaiheessa ELISA suoritettiin ei-ainoastaan kuten on kuvattu kohdassa b) edellä, vaan myös kontrolli-ELISA suoritettiin käyttämällä seerumivapaata viljelyväliainetta, joka on saatu COS-1-soluista, jotka on tartutettu pcDL-pSR α 296:lla kiinteän faasin valmistamiseksi. Siten ne solulinjat, jotka reagoivat edelliseen, mutta eivät kontrolli-ELISAAN, valittiin kloonaukseen.

35

(g) Monoklonaalisen vasta-aineen puhdistus

Viljelyn kelluvaa osuutta anti-KM31-7 monoklonaalista vasta-ainetta
 5 tuottavasta hybridomasolulinjasta kerättiin, suodatin steriloitiin
 0,22 μm :n suodattimella (Millipore), ja sitten vasta-aine puhdistettiin
 käyttämällä MAbTrap GII:tä (Pharmacia).

(h) Monoklonaalisen vasta-aineen analyysi

10

1) Monoklonaalisen vasta-aineen antigeenispesifisyys

Monoklonaalisten vasta-aineiden varmistettiin olevan spesifisiä KM31-7-
 proteiinille immuunisaostustestillä käyttämällä seerumivapaata viljelyn
 15 kelluvaa osuutta, joka oli saatu COS-1-soluista, jotka oli tartutettu
 pSR α 31-7:llä.

2) Monoklonaalisen vasta-aineen luokitus

20 Tämä testi suoritettiin käyttämällä hiiren monoklonaalista vasta-aine-
 kittiä (Amersham) ja vasta-aine tunnistettiin kuuluvan IgG1-aliluok-
 kaan.

Esimerkki 17

25

KM31-7-proteiinin eristys ja puhdistus
käyttämällä antigeeni-vasta-ainereaktiota

Tämä suoritettiin kuten on kuvattu edellä esimerkin 16h kohdassa 1).

30 Sama testi toistettiin myös käyttämällä vasta-ainetta ja seerumivapaata
 supernatanttia, joka on saatu COS-1-soluista, jotka on tartutettu
 pcDL pSR α 296:lla.

1,4 μg monoklonaalista vasta-ainetta lisättiin 1,7 ml:aan kuhunkin
 35 seerumivapaaseen kelluvaa osuuteen ja annettiin reagoida huoneenläm-
 mössä yhden tunnin samalla, kun sentrifugoitiin nopeudella 20 rpm

2,2 ml:n mikrosentrifugiputkessa. Vertailu suoritettiin käyttämällä seerumivapaata kelluvaa osuutta, joka oli saatu COS-1-soluista, jotka oli tartutettu pSR α 31-7:llä, mutta lisäämättä monoklonaalista vasta-ainetta.

5

30 μ l Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia), joka oli aiemmin pesty 0,1 %:sella Tween 20/PBS, lisättiin kuhunkin putkeen vasta-aineen adsorboimiseksi ja sentrifugointia jatkettiin nopeudella 20 rpm 30 min. huoneenlämmössä.

10

Tämän jälkeen jokaista seosta sentrifugoitiin useita sekunteja nopeudella 10.000 rpm mikrosentrifugissa, ja sitten kelluva osuus erotettiin huolellisesti, jotta ei menetettäisi enää sedimenttiä. Pelletit pestiin sitten yksitellen 0,1 %:sella Tween 20/PBS:llä ja sitten mikrosentrifugoitiin ja pestiin samalla tavalla vielä viisi kertaa.

15

Tuloksena saatu sedimentti suspensoitiin SDS-PAGEEN koepuskuriliuokseen, joka sisälsi 10 μ l 2-merkaptetaanolia. Kukin suspensio kuumennettiin lämpötilassa 90°C 2 min. ja sitten SDS-PAGE suoritettiin pelkistävissä olosuhteissa käyttämällä 12,5 % geeliä. Sähköforeesin jälkeen tuote siirrettiin polyakryyliamidigeelistä nitroselluloosakalvolle (BUO-RAD). Western-blottaus suoritettiin käyttämällä polyklonaalista anti-KM31-7 vasta-ainetta, joka on kuvattu esimerkissä 1 osassa (a) ja anti-KM31-7 monoklonaalinen vasta-aine määritettiin KM31-7-proteiinin saostamiseksi erityisesti COS-1/pSR α 31-7 seerumivapaasta viljelyn kel-

20

25

Esimerkki 18

30 CYVV-NIa/KM31-7 fuusioproteiinin valmistus

KM31-7-proteiinin ilmaisemiseksi käyttämällä CYVV-NIa-proteaaasitekniikkaa, on välttämätöntä sitoa NIa-geenin 3'-pääte samaan ORF:ään kuin KM31-7-proteiini DNA. Siten suoritettiin seuraava kahden vaiheen menetelmä.

35

i) KM31-7 cDNA:n 3'-sivuketjun (SmaI-XbaI, 1006 bp)
sisällyttäminen pKSUN9:ään

- SmaI-XbaI-fragmentin saamiseksi (1006 bp), joka sisälsi Km31-7 cDNA:n
 5 3'-päätteen, 7 µg pSRα31-7-plasmidia DNA merkittiin restriktioentsyymeillä SmaI ja XbaI, ja tuloksena saatu fragmentti kerättiin ja puhdistettiin käyttämällä GENE CLEAN II (Funakoshi Japan) käyttämällä 0,8 % agarosigeeliä.
- 10 Sillä aikaa, 5 µg pKSUN9:n plasmidia DNA merkittiin samalla tavalla SmaI:llä ja XbaI:llä ja halkaisufragmentti defosforyloitiin härän alkaliinifosfotaasilla (alkaliinifosfotaasi E. coli C75, Takara Shuzo, Japan). Tuloksena saatu defosforyloitu linearisoitu DNA sidottiin SmaI-XbaI KM-31 fragmentilla käyttämällä sidontakittiä (Takara Shuzo)
 15 ja tuloksena saatua rakennetta käytettiin E. coli-kannan JM109 siirtämiseksi. Siirrännäiset valittiin ja seulottiin pNia31-7SX-kloonin saamiseksi, joka sisälsi SmaI-XbaI-fragmentin.

ii) Nia-proteaasin ja KM31-7:n sitominen

- 20 Nia:n C-pääte-sekvenssin sitomiseksi KM31-7 alityypin N-pääte-sekvenssiin, jolla on Val N-päätejäännös samassa lukukehyksessä, neljän tyypistä polymeraasin ketjureaktioprimeerejä (PCR) rakennettiin käyttämällä Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems 392-mallin DNA-syntetisoijaa. Primeerit ovat seuraavat:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------|
| 5' GGT CAG CAC AAA TTT CCA 3' | SEQ. ID NRO 15 (1) |
| 5' AAA CAC AAC TTG GAA TGA ACA ATT 3' | SEQ. ID NRO 16 (2) |
| 5' TCA TTC CAA GTT GTG TTT GTG AAA 3' | SEQ. ID NRO 17 (3) |
| 30 5' CAT AGG ATG CTC CAA CAA 3' | SEQ. ID NRO 18 (4) |

- PCR:n ensimmäinen kierros suoritettiin käyttämällä 1 µg pKSUN9 plasmidi DNA:ta templaattina. 100 pmol kutakin primeeriä (1) ja (2) ja 1/10 tilavuus 10-kertaista konsentraatiota Taq-polymeraasireaktion puskuriliuosta ja lopuksi 5 yksikköä Taq-polymeraasia (Takara Shuzo) lisättiin
 35

reaktio-liuokseen mainitussa järjestyksessä. PCR-reaktio suoritettiin ensin lämpötilassa 72°C 3 min. ja sen jälkeen 30 kierrosta seuraavasti: lämpötilassa 94°C 1 min., lämpötilassa 55°C 2 min. ja lämpötilassa 72°C 3 min. ja lopulta käsittelylämpötilassa 72°C 10 min. PCR-reaktion jälkeen, parannetulle DNA-tuotteelle tehtiin 8 % polyakryyliamidigeeli-sähköforeesi. Geeliliuskoja, jotka sisälsivät DNA:ta, tunnistettiin etidiumbromidivärjäyksellä ja hajotettiin. 300 µl eluointipuskuria (0,5 ammoniumasetaatti, 1 mM EDTA, pH 8,0) lisättiin kuhunkin murskatuun liuskaan ja haudottiin lämpötilassa 37°C yön yli. Sentrifugointi antoi kelluvaa osuutta, joka sisälsi puhdistettua ja vahvistettua DNA:ta.

PCR suoritettiin taas kerran samalla tavalla, mutta käyttämällä 1 µg pUCKM31-7-plasmidia DNA-templaattina ja käyttämällä primeereitä (3) ja (4) ja tuloksena saatu DNA puhdistettiin kuten edellä.

Vahvistettu fragmentti ensimmäisestä PCR:stä sisälsi sekvenssin, joka koodasi jäännöksiä KM311-7 proteiinin N-päätteestä alkaen Val-Val-Phe:stä 31 bp ylävirtaan Nla:n XhoI-paikasta. Vahvistettu fragmentti toisesta PCR:stä sisälsi sekvenssin, joka koodasi sekvenssiä Asn-Cys-Ser-Phe-Gln Nla:n C-päätteestä 32 bp alavirtaan KM31-7 cDNA:n SmaI-paikasta.

Siten, kun PCR suoritettiin käyttämällä molempia DNA-fragmentteja, jotka olivat tuloksia kahdesta PCR:stä, primeerien (1) ja (4) kanssa, tulos on hybridisoitu säie, joka koostuu Nla:n 3'-päätteen 9 bp:stä ja sekvenssin 15 bp:stä, joka koodaa haluttua KM31-7:n N-päätettä. Siten on mahdollista saada yhdistetty DNA-sekvenssi, jossa on tämä osa sidottuna.

Tämän logiikan tuloksena PCR:n toinen kierros suoritettiin juuri tällä tavalla ja parannettu fragmentti kerättiin geelistä.

iii) Nla/KM31-7 DNA:n sisällyttäminen pNla31-7SX:ään

5 µg pNla31-7SX plasmidi DNA:ta, joka on saatu kohdassa i), liuotettiin XhoI:llä ja SmaI:llä, ja tuloksena saatu DNA defosforyloitiin käsitte-

lemällä härän alkaliinifosfotaasilla. Kohdassa ii) valmistettu PCR-tuote liuotettiin myös XhoI:llä ja SmaI:llä, ja tuloksena saatu fragmentti sidottiin sitten liuotetulla defosforyloidulla pNla31-7SX:llä käyttämällä sidontakittiä. Tuloksena saatua rakennetta käytettiin E. colin kannan JM109 siirtämiseksi.

Amp^R-transformantteja valittiin sitten ja seulottiin. Seulonta suoritettiin liuottamalla XhoI:llä sähköforeesilla. Sellaiset kloonit, joissa oli ainostaan 8,0 kbp alue, valittiin. Valittujen kloonien plasmidit liuotettiin sitten HindIII:lla ja niille tehtiin taas sähköforeesi. Plasmidi, joka valittiin, oli 330 bp alue, joka vastasi Nla cDNA inserttiosaa. Tämä plasmidi merkittiin pNla31-7V:llä ja se sisälsi XhoI ja SmaI PCR-tuotteen.

Kloonin pNla31-7V emäsekvenssi määritettiin ja varmistettiin, että sekvenssit, jotka koodaavat Nla ja KM31-7, sidottiin samaan ORF:ään välttämättömällä geenin halkaisusekvenssillä, joka on Nla ja KM31-7-proteiinien välissä.

iv) KM31-7 proteiinin tuottaminen

Western-blottaus varmisti, että pNla31-7V toimi E. colissa ja että KM31-7 proteiinia ilmaisi rakennettu rekombinanttigeeni.

E. colin siemenviljelmää, jossa on plasmidi pNla31-7V, viljeltiin yön yli ravistamalla 3 ml:ssa LB-väliainetta, joka sisälsi 50 µg/ml ampisiliiniä. Yksi ml siemenviljelmää lisättiin 100 ml:aan tuoretta LB-väliainetta, joka sisälsi 50 µg/ml ampisiliiniä ja viljeltiin lämpötilassa 37°C ravistamalla, kunnes OD_{600 nm} saavutti arvon 1,0. Tässä vaiheessa IPTG:tä lisättiin viljelynesteeseen lopulliseen konsentraatioon 1 mM, ja viljelmää haudottiin sitten lämpötilassa 28°C vielä kaksi yötä ravistaen.

Tämän jälkeen 1 ml viljelmää siirrettiin mikrosentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin 5 min. nopeudella 15.000 rpm. Kelluva osuus erotettiin ja pelletti sekoitettiin 300 µl:n kanssa steriiliä vettä ja 300 µl:n

kanssa SDS-PAGE näytepuskuriliuosta, joka sisälsi 2-merkaptotoetanolia asettuneiden solurunkojen hajottamiseksi. Tuloksena saatua suspensiota kuumennettiin lämpötilassa 95°C 2 min. ja sitten 10 µl:lle tätä suspensiota tehtiin SDS-PAGE 8 %:sella geelillä pelkistävässä olosuhteissa.

5

Sähköforeesin jälkeen proteiini siirrettiin geelistä nitroselluloosamembraanille. Tämä saavutettiin saattamalla geeli kontaktiin membraanin kanssa ja hautomalla transkriptiopuskuriliuoksen läsnäollessa (25 mM Tris-HCl, 1,4 % glysiini ja 20 % metanoli) lämpötilassa 4°C 2,5 tuntia ja jännitteellä 19 V käyttämällä geelimembraanitranskriptiolaitetta (Marisol Japan).

Nitroselluloosamembraani pestiin sitten 20 ml:lla PBS-T-väliainetta ja blokkaukset suoritettiin yhden tunnin ajan 20 ml:ssa PBS-T:tä, joka sisälsi 5 % kuohumaitoa (Snow Brand Co., Ltd). Tämän jälkeen membraani huuhdeltiin kahdella 20 ml:n PBS-T-erällä ja sitten annettiin reagoida 90 min. ajan 20 ml:ssa PBS-T:tä, joka sisälsi 1 µl 100-kertaa laimennettua anti-KM31-7 kanin MAb-seerumia (primäärinen vasta-aine) steriilissä vedessä. Nitroselluloosakalvo huuhdeltiin sitten 15 min. ja sitten kaksi kertaa 5 min. kukin 20 ml:lla PBS-T:tä.

Pesty membraani asetettiin sitten 3.000-kertaiseen laimennettuun peroksidaasimerkittyyntä anti-kani IgG vuohen vasta-ainehauteeseen (BIO-RAD) PBS-T:ssä (käytetty sekundäärisenä vasta-aineena edellä) ja annettiin seistä tunnin ajan. Membraani pestiin sitten 20 ml:lla PBS-T:tä ja siirrettiin ECL-tunnistusreagenssihauteeseen (Amersham) ja alueet, jotka reagoivat anti-KM31-7 vasta-aineen kanssa tunnistettiin autoradiografialla.

Western-blottaus suoritettiin ja alue, jolla on molekyylipaino karkeasti ottaen 60.000, tunnistettiin. Tällä alueella oli sama liikkuvuus kuin proteiinilla, jolla oli KM31-7-proteiinin toiseksi suurin molekyylipaino tunnistettuna seerumivapaasta viljelyn kelluvasta osuudesta, joka on saatu tartuttamalla COS-1-soluja pSRα31-7:llä, jota käytettiin vertailuna.

Väliaineetx M Fosfaattipuskuri

- 5 Na_2HPO_4 :n x M -liuos, joka on säädetty haluttuun pH-arvoon käyttämällä NaH_2PO_4 :n x M -liuosta.

Sisällytyspuskuri

- 10 0,1 M Tris-HCl-puskuria, pH 7,0, 0,05 M EDTA, 1 % 2-merkapttoetanolia.

Uuttopuskuri

- 15 0,1 M Tris-HCl-puskuria, 0,05 M EDTA, 1 % 2-merkapttoetanolia, pH 7,0.

Hajotusliuos

- 20 200 mM ammoniumkarbonaattia, 2 % SDS, 2 mM EDTA, 400 $\mu\text{g/ml}$ bentoniittia ja 20 $\mu\text{g/ml}$ proteaasia K (pH 9,0).

1 x SSC

0,15 M NaCl, 0,015 M trinatiumpsitraattia, pH 7,0.

- 25 Nestemäinen LB-väliaine

10 g Bacto-tryptonia (Difco), 5 g Bacto-hiivauutetta (Difco) ja 5 g natriumkloridia, kaikki laimennettu 1 litraksi tislattulla vedellä.

- 30 Tris-kalsiumpuskuri

10 mM Tris, 50 mM kalsiumkloridia, säädetty pH-arvoon 7,4 kloorivetyhapolla.

Hajotuspuskuri

0,17 g sakkaroosia, 250 μ l 1 M Tris-HCl-puskuria (pH 8,0), 200 μ l 0,5 M EDTA, (pH 8,0), laimennettu 20 ml:ksi jälleentislattulla vedellä.

5

Alkaliini-SDS-liuos

0,2 M natriumhydroksidia, 1 % SDS.

10 TBE-liuos

100 mM Tris, 100 mM boorihappoa, 1 mM EDTA.

Denaturointiliuos

15

1,5 M natriumkloridia, 0,5 M natriumhydroksia.

Neutralisointipuskuri

20 0,5 M Tris, 3 M natriumkloridia (pH 7,4).

50 x Denhardtin liuos

1 % polyvinyyli-pyrrolidonia, 1 % härän seerumialbumiinia,

25 1 % Ficoll 400. Tämä liuos laimennetaan sitten jälleentislattulla vedellä halutun konsentraation saamiseksi.

5 x Denaturointipuskuri

30 125 μ l 1 M glysiiniä (pH 9,0), 25 μ l 1 M magnesiumkloridia, 850 μ l jälleentislattua vettä.

5 x Merkintäpuskuri

35 25 μ l 1 M Tris-HCl-puskuria (pH 7,9), 5 μ l 1 M magnesiumkloridia, 2,5 μ l 1 M ditiotreitolia, 9,2 μ l jälleentislattua vettä.

10 x M9 Suolaliuos

0,145 M dinatriumvetyfosfaattia, 0,172 M kaliumdivetyfosfaattia,
0,187 M ammoniumkloridia, 0,137 M natriumkloridia, pH 7,0.

5

M9 Minimiagariväliaine

10 ml 10 x M9 suolaliuosta, 100 µl 1 M magnesiumsulfaattia, 1 ml 20 %
glukoosia, 50 µl 1 % tiamiinihydrokloridisuolaa, 1 ml 0,01 M kalsium-
10 kloridia ja 13 ml jälleentislattua vettä, kaikki sekoitettuna, steri-
loitu suodattamalla, ja sitten kaadettu levyille välittömästi sen jäl-
keen, kun oli lisätty 50 ml 3 % bactoagaria.

Nestemäinen SOB-väliaine

15

10 g bactotryptonia, 2,5 g bactohiivauutetta, 100 µl 5 M natriumklori-
dia ja 125 µl 1 M kaliumkloridia sekoitetaan ja laimennetaan 500 ml:ksi
tislattulla vedellä. Autoklavisoinnin jälkeen 5 ml 1 M magnesiumkloridia
ja 5 ml 1 M magnesiumsulfaattia lisätään.

20

TFB1-puskuri

5 ml 1 M 2-(-N-morfoliino)etaanisulfonihappoa (MES - säädetty pH-arvoon
6,2 1 N HCl:llä), 6,045 g rubidiumkloridia, 0,735 g kalsiumkloridi-
25 dihydraattia ja 4,94 g mangaanikloriditetrahydraattia sekoitettiin,
säädetty pH-arvoon 5,8 jääetikkahapolla, laimennettu 500 ml:ksi jäl-
leentislattulla vedellä ja steriloitu suodattamalla.

TBF2-puskuri

30

1 ml 1 M 2-(N-morfoliino)propaanisulfonihappoa (MOPS), 1,102 g kal-
siumkloridibihydraattia, 0,12 g rubidiumkloridia ja 15 ml glyserolia
sekoitettuna, säädetty pH-arvoon 5,8 jääetikkahapolla, laimennettu
100 ml:ksi jälleentislattulla vedellä ja steriloitu suodattamalla.

35

Nestemäinen SOC-väliaine

5 ml nestemäistä SOB-väliainetta, 90 μ l 20 % glukoosia.

5 2 x YT-väliaine

16 g bactotryptonia, 5 g bactohiivauutetta ja 5 g natriumkloridia sekoitettiin ja laimennettiin 1 litraksi jälleentislatulla vedellä.

10 PBS-Tw-väliaine

80 mM dinatriumvetyfosfaattia, 20 mM natriumdivetyfosfaattia, 100 mM natriumkloridia, 0,1 % Tween 20.

15 PBS-T-väliaine

4 g natriumkloridia, 0,1 g kaliumdihydrofosfaattia, 1,45 g dinatriumvetyfosfaatti-dodekahydraattia, 0,1 g kaliumkloridia ja 0,1 g natriumatsidia, kaikki sekoitettu 1 litraksi jälleentislatulla vedellä, pH 7,4.

Alkaalinen fosfotaasisubstraattiliuos

0,01 % p-nitrofenyylifosfaattia liuotettuna 10 %:seen vesipitoiseen dietanoliamiiniliuokseen, jonka pH oli säädetty arvoon 9,8 kloorivetyhapolla.

Väliaine A

30 DMEM (Dulbeccan modifioitu Eagle-väliaine, joka sisältää 4,5 g/l glukoosia) 10 % inaktivoitua härän sikiön seerumia (valmistaja Hyclone) ja 10 mM HEPES (pH 7,2).

Väliaine B

- DMEM (joka sisältää 4,5 g/l glukoosia), 10 mM HEPES (pH 7,2), 3 % inaktivoitua härän sikiön seerumia, 5 µg/ml d-biotiinia (valmistaja Sigma),
- 5 4 µg/ml pantoteenihappoa (valmistaja Sigma), 1,0 µM deksametasonia (valmistaja Sigma) ja 0,5 mM isobutyylimetyyliksantiinia (valmistaja Aldrich).

Väliaine C

10

DMEM (joka sisältää 4,5 g/l glukoosia), joka sisältää 5 % inaktivoitua härän sikiön seerumia, 10 mM HEPES (pH 7,2) ja 100 ng/ml härän insuliinia.

15 Väliaine D

DMEM (joka sisältää 4,5 g/l glukoosia), 5 % inaktivoitua härän sikiön seerumia, 10 mM HEPES (pH 7,2), 100 ng/ml härän insuliinia ja 10 U/ml natriumhepariinia (valmistaja Novo Industry Co.).

20

LPL-substraattiliuos

- 13 mM glyseroli-tri[9,10(n)-³H]oleaattia (51,8 KBq/µmol, valmistaja Amersham), 1,3 mg/ml L-α-fosfatidyylikoliini-distearoyyliä (valmistaja
- 25 Sigma Co.), 20 mg/ml härän sikiön seerumia (valmistaja Sigma Co.), 135 mM Tris-hydrokloridia [Tris-HCl (pH 8,1), (valmistaja Sigma Co.)], 16,5 % (t/t) glyserolia ja 16,5 % (t/t) inaktivoitua härän sikiön seerumia.

30 Guanidiinitiosyanaattiliuos

4 M guanidiinitiosyanaattia, 1 % Sarkosyliä, 20 mM etyleenidiamiini-tetraetikkahappoa (EDTA), 25 mM natriumsitraattia (pH 7,0), 100 mM 2-merkaptetaanolia ja 0,1 % antifoam A (Sigma).

35

Adsorptiopuskuri

0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA ja 0,1 % SDS.

5 Eluointiliuos

10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA ja 0,05 % SDS.

Esimerkin 2 käänteistranskriptaasi-reaktioliuos

10

50 ml Tris-HCl (pH 8,3), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 0,3 mM ditiotreitolia, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 10 µCi [α -³²P]dCTP ja 1,5 µg vektori-primeeri-DNA:ta (3'-oligo(dT)-päätteinen pcVD-1, Pharmacia).

15 Päätetransferaasi-reaktioliuos

140 mM kalsiumkakodylaattia, 30 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1 mM CoCl₂, 0,5 mM ditiotreitolia, 0,2 µg poly A ja 100 mM dCTP.

20 Restriktioentsyymipuskuri

50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂ ja 1 mM ditiotreitolia.

10-tilavuuden ligaasipuskuri

25

10 mM ATP, 660 mM Tris-HCl (pH 7,5), 66 mM MgCl₂ ja 100 mM ditiotreitolia.

Sähköforeesipigmentti

30

50 % glyserolia, 0,01 M dinatriumvetyfosfaattia (pH 7,0) ja 0,4 % bromifenolisinistä.

1 x TAE

35

0,04 M Tris-asetaatia, 0,001 M EDTA.

1 x SSCP

120 mM NaCl, 15 mM natriumsitraattia, 13 mM kaliumdivetyfosfaattia ja 1 mM EDTA.

5

Esimerkin 6 mukainen käänteistranskriptaasi-reaktioliuos

1 x ensimmäisen säikeen synteessipuskuria, 5 % natriumpyrofosfaattia, 100 yksikköä ribonukleasi-inhibiittoria, 1 mM dATP, 1 mM dGTP,
10 1 mM dTTP, 0,5 mM dCTP ja 3,75 µg oligo(dt)-primeeriä, kaikki saatu cDNA-kloonausjärjestelmällä (Amersham).

SM-puskuri

15 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄•7H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) ja 0,01 % gelatiinia.

Dialyysipuskuri

20 20 mM fosfaattipuskuria (pH 7,8) ja 0,5 M NaCl.

Kolonnipuskuri

10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl ja 1 mM EDTA.

25

Taq-polymeraasireaktiopuskuriliuos

Taq, joka sisältää 500 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP ja 2 mg/ml

30 gelatiinia.

Sekvenssilistaukset:

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 1

Sekvenssin pituus: 1320

Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo

Säikeisyys: kaksisäikeinen

Topologia: lineaarinen

Molekyylityyppi: cDNA ... mRNA

Anti-sense: ei

Alkuperäinen lähde:

Organismi: clover yellow vein -virus

Ominaisuus:

1-1320 E CDS

10-1311 E mat-peptidi

Sekvenssin kuvaus:

AAG TTC CAA GGG AAA AGT AAG AGA ACA AGA CAA AAG TTG AAG TTC AGA 48
Lys Phe Gln Gly Lys Ser Lys Arg Thr Arg Gln Lys Leu Lys Phe Arg
1 5 10 15

GCG GCA AGA GAC ATG AAG GAT CGT TAT GAA GTG CAT GCC GAT GAG GGG 96
Ala Ala Arg Asp Met Lys Asp Arg Tyr Glu Val His Ala Asp Glu Gly
20 25 30

ACT TTA GTG GAA AAT TTT GGA ACT CGT TAT TCA AAG AAA GGC AAG ACA 144
Thr Leu Val Glu Asn Phe Gly Thr Arg Tyr Ser Lys Lys Gly Lys Thr
35 40 45

AAA GGT ACT GTT GTG GGT TTG GGT GCA AAA ACA AGA CGG TTC ACT AAC 192
Lys Gly Thr Val Val Gly Leu Gly Ala Lys Thr Arg Arg Phe Thr Asn
50 55 60

ATG	TAT	GGT	TTT	GAC	CCC	ACG	GAG	TAT	TCA	TTT	GCT	AGG	TAT	CTT	GAT	240
Met	Tyr	Gly	Phe	Asp	Pro	Thr	Glu	Tyr	Ser	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Asp	
65					70				75						80	

CCA	ATC	ACG	GGT	GCA	ACA	TTG	GAT	GAA	ACC	CCA	ATT	CAC	AAT	GTA	AAT	288
Pro	Ile	Thr	Gly	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Thr	Pro	Ile	His	Asn	Val	Asn	
			85					90						95		

TTG	GTT	GCT	GAG	CAT	TTT	GGC	GAC	ATA	AGG	CTT	GAT	ATG	GTT	GAC	AAG	336
Leu	Val	Ala	Glu	His	Phe	Gly	Asp	Ile	Arg	Leu	Asp	Met	Val	Asp	Lys	
		100						105					110			

GAG	TTA	CTT	GAC	AAA	CAG	CAC	TTA	TAC	CTC	AAG	AGA	CCA	ATA	GAA	TGT	384
Glu	Leu	Leu	Asp	Lys	Gln	His	Leu	Tyr	Leu	Lys	Arg	Pro	Ile	Glu	Cys	
	115						120					125				

TAC	TTT	GTA	AAG	GAT	GCT	GGT	CAG	AAG	GTG	ATG	AGG	ATT	GAT	CTA	ACA	432
Tyr	Phe	Val	Lys	Asp	Ala	Gly	Gln	Lys	Val	Met	Arg	Ile	Asp	Leu	Thr	
	130					135					140					

CCC	CAC	AAC	CCA	TTG	TTG	GCA	AGC	GAT	GTT	AGC	ACA	ACC	ATA	ATG	GGT	480
Pro	His	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Ser	Asp	Val	Ser	Thr	Thr	Ile	Met	Gly	
145				150					155					160		

TAT	CCT	GAG	AGA	GAA	GGT	GAA	CTC	CGT	CAA	ACT	GGA	AAG	GCA	AGG	TTA	528
Tyr	Pro	Glu	Arg	Glu	Gly	Glu	Leu	Arg	Gln	Thr	Gly	Lys	Ala	Arg	Leu	
			165					170					175			

GTC	GAC	CCA	TCA	GAG	TTG	CCC	GCG	CGG	AAT	GAG	GAT	ATT	GAT	GCA	GAG	576
Val	Asp	Pro	Ser	Glu	Leu	Pro	Ala	Arg	Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Ala	Glu	
			180					185					190			

TTT	GAG	AGT	CTA	AAT	CGC	ATA	AGT	GGT	TTG	CGC	GAC	TAT	AAT	CCC	ATT	624
Phe	Glu	Ser	Leu	Asn	Arg	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ile	
		195					200					205				

TCA	CAA	AAT	GTT	TGC	TTG	CTA	ACA	AAT	GAG	TCA	GAA	GGC	CAT	AGA	GAG	672
Ser	Gln	Asn	Val	Cys	Leu	Leu	Thr	Asn	Glu	Ser	Glu	Gly	His	Arg	Glu	
	210						215					220				

AAG ATG TTT GGA ATT GGA TAT GGT TCA GTG ATC ATT ACA AAT CAA CAT 720
 Lys Met Phe Gly Ile Gly Tyr Gly Ser Val Ile Ile Thr Asn Gln His
 225 230 235 240

CTG TTC AGA AGG AAT AAT GGG GAG TTA TCA ATT CAA TCC AAG CAT GGC 768
 Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly Glu Leu Ser Ile Gln Ser Lys His Gly
 245 250 255

TAC TTC AGA TGC CGC AAC ACC ACA AGC TTG AAG ATG CTG CCT TTG GAG 816
 Tyr Phe Arg Cys Arg Asn Thr Thr Ser Leu Lys Met Leu Pro Leu Glu
 260 265 270

GGA CAT GAC ATT TTG TTG ATT CAG TTA CCA AGG GAC TTT CCA GTG TTT 864
 Gly His Asp Ile Leu Leu Ile Gln Leu Pro Arg Asp Phe Pro Val Phe
 275 280 285

CCA CAA AAG ATT CGC TTT AGG GAG CCA AGA GTG GAT GAC AAA ATT GTT 912
 Pro Gln Lys Ile Arg Phe Arg Glu Pro Arg Val Asp Asp Lys Ile Val
 290 295 300

TTG GTC AGC ACA AAT TTC CAG GAA AAG AGT TCC TCG AGC ACG GTC TCA 960
 Leu Val Ser Thr Asn Phe Gln Glu Lys Ser Ser Ser Ser Thr Val Ser
 305 310 315 320

GAG TCC AGT AAC ATT TCA AGA GTG CAG TCA GCC AAT TTC TAC AAG CAT 1008
 Glu Ser Ser Asn Ile Ser Arg Val Gln Ser Ala Asn Phe Tyr Lys His
 325 330 335

TGG ATC TCA ACA GTA GCA GGA CAC TGT GGA AAC CCT ATG GTT TCG ACT 1056
 Trp Ile Ser Thr Val Ala Gly His Cys Gly Asn Pro Met Val Ser Thr
 340 345 350

AAA GAT GGA TTT ATT GTA GGT ATC CAC AGT CTT GCT TCA TTG ACA GGC 1104
 Lys Asp Gly Phe Ile Val Gly Ile His Ser Leu Ala Ser Leu Thr Gly
 355 360 365

GAC GTT AAC ATC TTC ACA AGC TTT CCG CCG CAG TTT GAG AAC AAA TAT 1152
 Asp Val Asn Ile Phe Thr Ser Phe Pro Pro Gln Phe Glu Asn Lys Tyr
 370 375 380

CTA CAG AAG CTC AGT GAA CAC ACA TGG TGT AGT GGA TGG AAA CTA AAT 1200
 Leu Gln Lys Leu Ser Glu His Thr Trp Cys Ser Gly Trp Lys Leu Asn
 385 390 395 400

CTT GGA AAG ATT AGT TGG GGT GGA ATC AAC ATT GTG GAG GAT GCA CCT 1248
 Leu Gly Lys Ile Ser Trp Gly Gly Ile Asn Ile Val Glu Asp Ala Pro
 405 410 415

GAA GAG CCC TTT ATA ACA TCC AAG ATG GCA AGC CTT CTT AGT GAT TTG 1296
 Glu Glu Pro Phe Ile Thr Ser Lys Met Ala Ser Leu Leu Ser Asp Leu
 420 425 430

AAT TGT TCA TTC CAA GCA AGT GCG 1320
 Asn Cys Ser Phe Gln Ala Ser Ala
 435 440

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 2

Sekvenssin pituus: 440

Sekvenssin tyyppi: aminohappo

Topologia: lineaarinen

Molekyylylityyppi: proteiini

Anti-sense: ei

Alkuperäinen lähde:

Organismi: clover yellow vein -virus

Ominaisuus:

4-437 E mat-peptidi

Sekvenssin kuvaus:

Lys Phe Gln Gly Lys Ser Lys Arg Thr Arg Gln Lys Leu Lys Phe Arg
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Asp Met Lys Asp Arg Tyr Glu Val His Ala Asp Glu Gly
 20 25 30
 Thr Leu Val Glu Asn Phe Gly Thr Arg Tyr Ser Lys Lys Gly Lys Thr
 35 40 45
 Lys Gly Thr Val Val Gly Leu Gly Ala Lys Thr Arg Arg Phe Thr Asn
 50 55 60

Met	Tyr	Gly	Phe	Asp	Pro	Thr	Glu	Tyr	Ser	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Asp	
65					70					75					80	
Pro	Ile	Thr	Gly	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Thr	Pro	Ile	His	Asn	Val	Asn	
				85					90					95		
Leu	Val	Ala	Glu	His	Phe	Gly	Asp	Ile	Arg	Leu	Asp	Met	Val	Asp	Lys	
			100					105					110			
Glu	Leu	Leu	Asp	Lys	Gln	His	Leu	Tyr	Leu	Lys	Arg	Pro	Ile	Glu	Cys	
			115				120					125				
Tyr	Phe	Val	Lys	Asp	Ala	Gly	Gln	Lys	Val	Met	Arg	Ile	Asp	Leu	Thr	
	130					135					140					
Pro	His	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Ser	Asp	Val	Ser	Thr	Thr	Ile	Met	Gly	
145					150					155					160	
Tyr	Pro	Glu	Arg	Glu	Gly	Glu	Leu	Arg	Gln	Thr	Gly	Lys	Ala	Arg	Leu	
				165					170					175		
Val	Asp	Pro	Ser	Glu	Leu	Pro	Ala	Arg	Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Ala	Glu	
			180					185					190			
Phe	Glu	Ser	Leu	Asn	Arg	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ile	
	195						200					205				
Ser	Gln	Asn	Val	Cys	Leu	Leu	Thr	Asn	Glu	Ser	Glu	Gly	His	Arg	Glu	
	210					215					220					
Lys	Met	Phe	Gly	Ile	Gly	Tyr	Gly	Ser	Val	Ile	Ile	Thr	Asn	Gln	His	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Arg	Arg	Asn	Asn	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Gln	Ser	Lys	His	Gly	
				245					250					255		
Tyr	Phe	Arg	Cys	Arg	Asn	Thr	Thr	Ser	Leu	Lys	Met	Leu	Pro	Leu	Glu	
			260					265					270			
Gly	His	Asp	Ile	Leu	Leu	Ile	Gln	Leu	Pro	Arg	Asp	Phe	Pro	Val	Phe	
	275						280					285				
Pro	Gln	Lys	Ile	Arg	Phe	Arg	Glu	Pro	Arg	Val	Asp	Asp	Lys	Ile	Val	
	290					295					300					
Leu	Val	Ser	Thr	Asn	Phe	Gln	Glu	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	
305					310					315					320	
Glu	Ser	Ser	Asn	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ser	Ala	Asn	Phe	Tyr	Lys	His	
			325						330					335		
Trp	Ile	Ser	Thr	Val	Ala	Gly	His	Cys	Gly	Asn	Pro	Met	Val	Ser	Thr	
			340					345					350			
Lys	Asp	Gly	Phe	Ile	Val	Gly	Ile	His	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Gly	
	355						360					365				

Asp	Val	Asn	Ile	Phe	Thr	Ser	Phe	Pro	Pro	Gln	Phe	Glu	Asn	Lys	Tyr
370						375					380				
Leu	Gln	Lys	Leu	Ser	Glu	His	Thr	Trp	Cys	Ser	Gly	Trp	Lys	Leu	Asn
385					390					395					400
Leu	Gly	Lys	Ile	Ser	Trp	Gly	Gly	Ile	Asn	Ile	Val	Glu	Asp	Ala	Pro
				405					410					415	
Glu	Glu	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Lys	Met	Ala	Ser	Leu	Leu	Ser	Asp	Leu
			420					425					430		
Asn	Cys	Ser	Phe	Gln	Ala	Ser	Ala								
	435						440								

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 3
 Sekvenssin pituus: 25
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 GTCCATGGGG AAAAGTAAGA GAACA 25

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 4
 Sekvenssin pituus: 20
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 ACTCTGAGAC CGTGCTCGAG 20

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 5
 Sekvenssin pituus: 20
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 AGGAAAGAG TTCCTCGAGC 17

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 6
 Sekvenssin pituus: 36
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 AATTGTTTCAT TCCAAGCACC TGGGCCACCA CCTGGC 36

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 7
 Sekvenssin pituus: 36
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 GCCAGGTGGT GGCCCAGGTG CTTGGAATGA ACAATT 36

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 8
 Sekvenssin pituus: 30
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 TTGTCAGCAC ACCTGGGAGC TGTAGAGCTC 25

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 9
 Sekvenssin pituus: 7
 Sekvenssin tyyppi: aminohappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: proteiini
 Sekvenssin kuvaus:
 Ala Pro Gly Pro Pro Gly 7
 1 5

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 10
 Sekvenssin pituus: 7
 Sekvenssin tyyppi: aminohappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: proteiini
 Sekvenssin kuvaus:
 Pro Gly Pro Pro Gly Pro 7
 1 5

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 11
 Sekvenssin pituus: 1650
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Säikeisyys: kaksisäikeinen
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: cDNA ... mRNA
 Alkuperäinen lähde:
 Organismi: homo sapiens
 Ominaisuus:
 Symboli, joka ilmaisee ominaispiirrettä: CDS
 Sijainti, jos läsnä: 1...1647
 Menetelmä ominaispiirteen määrittämiseksi: E
 Symboli, joka ilmaisee ominaispiirrettä: mat-peptidi
 Sijainti, jos läsnä: 70...1647
 Menetelmä ominaispiirteen määrittämiseksi: E
 Symboli, joka ilmaisee ominaispiirrettä: sig-peptidi
 Sijainti, jos läsnä: 1...69
 Menetelmä ominaispiirteen määrittämiseksi: E
 Sekvenssi:

ATG	TCA	TGT	GAG	GAC	GGT	CGG	GCC	CTG	GAA	GGA	ACG	CTC	TCG	GAA	TTG	48
Met	Ser	Cys	Glu	Asp	Gly	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	
-23			-20					-15						-10		

GCC	GCG	GAA	ACC	GAT	CTG	CCC	GTT	GTG	TTT	GTG	AAA	CAG	AGA	AAG	ATA	96
Ala	Ala	Glu	Thr	Asp	Leu	Pro	Val	Val	Phe	Val	Lys	Gln	Arg	Lys	Ile	
		-5					1				5					

GGC	GGC	CAT	GGT	CCA	ACC	TTG	AAG	GCT	TAT	CAG	GAG	GGC	AGA	CTT	CAA	144
Gly	Gly	His	Gly	Pro	Thr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Gln	Glu	Gly	Arg	Leu	Gln	
10					15				20					25		

AAG	CTA	CTA	AAA	ATG	AAC	GGC	CCT	GAA	GAT	CTT	CCC	AAG	TCC	TAT	GAC	192
Lys	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ser	Tyr	Asp	
			30					35					40			

TAT	GAC	CTT	ATC	ATC	ATT	GGA	GGT	GGC	TCA	GGA	GGT	CTG	GCA	GCT	GCT	240
Tyr	Asp	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	
			45				50						55			

AAG GAG GCA GCC CAA TAT GGC AAG AAG GTG ATG GTC CTG GAC TTT GTC 288
Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val Leu Asp Phe Val
60 65 70

ACT CCC ACC CCT CTT GGA ACT AGA TGG GGT CTT GGA GGA ACA TGT GTG 336
Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val
75 80 85

AAT GTG GGT TGC ATA CCT AAA AAA CTG ATG CAT CAA GCA GCT TTG TTA 384
Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu
90 95 100 105

GGA CAA GCC CTG CAA GAC TCT CGA AAT TAT GGA TGG AAA GTC GAG GAG 432
Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp Lys Val Glu Glu
110 115 120

ACA GTT AAG CAT GAT TGG GAC AGA ATG ATA GAA GCT GTA CAG AAT CAC 480
Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala Val Gln Asn His
125 130 135

ATT GGC TCT TTG AAT TGG GGC TAC CGA GTA GCT CTG CGG GAG AAA AAA 528
Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu Arg Glu Lys Lys
140 145 150

GTC GTC TAT GAG AAT GCT TAT GGG CAA TTT ATT GGT CCT CAC AGG ATT 576
Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly Pro His Arg Ile
155 160 165

AAG GCA ACA AAT AAT AAA GGC AAA GAA AAA ATT TAT TCA GCA GAG AGA 624
Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr Ser Ala Glu Arg
170 175 180 185

TTT CTC ATT GCC ACT GGT GAA AGA CCA CGT TAC TTG GGC ATC CCT GGT 672
Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Gly
190 195 200

GAC AAA GAA TAC TGC ATC AGC AGT GAT GAT CTT TTC TCC TTG CCT TAC 720
Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe Ser Leu Pro Tyr
205 210 215

TGC CCG GGT AAG ACC CTG GTT GTT GGA GCA TCC TAT GTC GCT TTG GAG 768
 Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu
 220 225 230

TGC GCT GGA TTT CTT GCT GGT ATT GGT TTA GAC GTC ACT GTT ATG GTT 816
 Cys Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Val Thr Val Met Val
 235 240 245

AGG TCC ATT CTT CTT AGA GGA TTT GAC CAG GAC ATG GCC AAC AAA ATT 864
 Arg Ser Ile Leu Leu Arg Gly Phe Asp Gln Asp Met Ala Asn Lys Ile
 250 255 260 265

GGT GAA CAC ATG GAA GAA CAT GGC ATC AAG TTT ATA AGA CAG TTC GTA 912
 Gly Glu His Met Glu Glu His Gly Ile Lys Phe Ile Arg Gln Phe Val
 270 275 280

CCA ATT AAA GTT GAA CAA ATT GAA GCA GGG ACA CCA GGC CGA CTC AGA 960
 Pro Ile Lys Val Glu Gln Ile Glu Ala Gly Thr Pro Gly Arg Leu Arg
 285 290 295

GTA GTA GCT CAG TCC ACC AAT AGT GAG GAA ATC ATT GAA GGA GAA TAT 1008
 Val Val Ala Gln Ser Thr Asn Ser Glu Glu Ile Ile Glu Gly Glu Tyr
 300 305 310

AAT ACG GTG ATG CTG GCA ATA GGA AGA GAT GCT TGC ACA AGA AAA ATT 1056
 Asn Thr Val Met Leu Ala Ile Gly Arg Asp Ala Cys Thr Arg Lys Ile
 315 320 325

GGC TTA GAA ACC GTA GGG GTG AAG ATA AAT GAA AAG ACT GGA AAA ATA 1104
 Gly Leu Glu Thr Val Gly Val Lys Ile Asn Glu Lys Thr Gly Lys Ile
 330 335 340 345

CCT GTC ACA GAT GAA GAA CAG ACC AAT GTG CCT TAC ATC TAT GCC ATT 1152
 Pro Val Thr Asp Glu Glu Gln Thr Asn Val Pro Tyr Ile Tyr Ala Ile
 350 355 360

GGC GAT ATA TTG GAG GAT AAG GTG GAG CTC ACC CCA GTT GCA ATC CAG 1200
 Gly Asp Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu Leu Thr Pro Val Ala Ile Gln
 365 370 375

GCA GGA AGA TTG CTG GCT CAG AGG CTC TAT GCA GGT TCC ACT GTC AAG 1248
 Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Gly Ser Thr Val Lys
 380 385 390

TGT GAC TAT GAA AAT GTT CCA ACC ACT GTA TTT ACT CCT TTG GAA TAT 1296
 Cys Asp Tyr Glu Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr
 395 400 405

GGT GCT TGT GGC CTT TCT GAG GAG AAA GCT GTG GAG AAG TTT GGG GAA 1344
 Gly Ala Cys Gly Leu Ser Glu Glu Lys Ala Val Glu Lys Phe Gly Glu
 410 415 420 425

GAA AAT ATT GAG GTT TAC CAT AGT TAC TTT TGG CCA TTG GAA TGG ACG 1392
 Glu Asn Ile Glu Val Tyr His Ser Tyr Phe Trp Pro Leu Glu Trp Thr
 430 435 440

ATT CCG TCA AGA GAT AAC AAC AAA TGT TAT GCA AAA ATA ATC TGT AAT 1440
 Ile Pro Ser Arg Asp Asn Asn Lys Cys Tyr Ala Lys Ile Ile Cys Asn
 445 450 455

ACT AAA GAC AAT GAA CGT GTT GTG GGC TTT CAC GTA CTG GGT CCA AAT 1488
 Thr Lys Asp Asn Glu Arg Val Val Gly Phe His Val Leu Gly Pro Asn
 460 465 470

GCT GGA GAA GTT ACA CAA GGC TTT GCA GCT GCG CTC AAA TGT GGA CTG 1536
 Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Ala Ala Leu Lys Cys Gly Leu
 475 480 485

ACC AAA AAG CAG CTG GAC AGC ACA ATT GGA ATC CAC CCT GTC TGT GCA 1584
 Thr Lys Lys Gln Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ile His Pro Val Cys Ala
 490 495 500 505

GAG GTA TTC ACA ACA TTG TCT GTG ACC AAG CGC TCT GGG GCA AGC ATC 1632
 Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser Gly Ala Ser Ile
 510 515 520

CTC CAG GCT GGC TGC TGA 1650
 Leu Gln Ala Gly Cys
 525

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 12
 Sekvenssin pituus: 526
 Sekvenssin tyyppi: aminohappo
 Säikeisyys: yksisäikeinen
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylityyppi: peptidi
 Sekvenssi:

Met	Ser	Cys	Glu	Asp	Gly	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	
-23			-20					-15					-10			
Ala	Ala	Glu	Thr	Asp	Leu	Pro	Val	Val	Phe	Val	Lys	Gln	Arg	Lys	Ile	
		-5					1				5					
Gly	Gly	His	Gly	Pro	Thr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Gln	Glu	Gly	Arg	Leu	Gln	
10					15					20					25	
Lys	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ser	Tyr	Asp	
				30					35					40		
Tyr	Asp	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	
			45					50					55			
Lys	Glu	Ala	Ala	Gln	Tyr	Gly	Lys	Lys	Val	Met	Val	Leu	Asp	Phe	Val	
	60						65					70				
Thr	Pro	Thr	Pro	Leu	Gly	Thr	Arg	Trp	Gly	Leu	Gly	Gly	Thr	Cys	Val	
	75					80					85					
Asn	Val	Gly	Cys	Ile	Pro	Lys	Lys	Leu	Met	His	Gln	Ala	Ala	Leu	Leu	
90					95					100					105	
Gly	Gln	Ala	Leu	Gln	Asp	Ser	Arg	Asn	Tyr	Gly	Trp	Lys	Val	Glu	Glu	
				110					115					120		
Thr	Val	Lys	His	Asp	Trp	Asp	Arg	Met	Ile	Glu	Ala	Val	Gln	Asn	His	
			125					130					135			
Ile	Gly	Ser	Leu	Asn	Trp	Gly	Tyr	Arg	Val	Ala	Leu	Arg	Glu	Lys	Lys	
	140						145					150				
Val	Val	Tyr	Glu	Asn	Ala	Tyr	Gly	Gln	Phe	Ile	Gly	Pro	His	Arg	Ile	
	155					160				165						
Lys	Ala	Thr	Asn	Asn	Lys	Gly	Lys	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ser	Ala	Glu	Arg	
170					175					180					185	
Phe	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ile	Pro	Gly	
				190					195					200		
Asp	Lys	Glu	Tyr	Cys	Ile	Ser	Ser	Asp	Asp	Leu	Phe	Ser	Leu	Pro	Tyr	
		205						210				215				
Cys	Pro	Gly	Lys	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Ala	Ser	Tyr	Val	Ala	Leu	Glu	
	220						225					230				

Cys	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Leu	Asp	Val	Thr	Val	Met	Val	235	240	245
Arg	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Gly	Phe	Asp	Gln	Asp	Met	Ala	Asn	Lys	Ile	250	255	260
Gly	Glu	His	Met	Glu	Glu	His	Gly	Ile	Lys	Phe	Ile	Arg	Gln	Phe	Val	270	275	280
Pro	Ile	Lys	Val	Glu	Gln	Ile	Glu	Ala	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Leu	Arg	285	290	295
Val	Val	Ala	Gln	Ser	Thr	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu	Gly	Glu	Tyr	300	305	310
Asn	Thr	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Gly	Arg	Asp	Ala	Cys	Thr	Arg	Lys	Ile	315	320	325
Gly	Leu	Glu	Thr	Val	Gly	Val	Lys	Ile	Asn	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Ile	330	335	340
Pro	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Gln	Thr	Asn	Val	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Ile	350	355	360
Gly	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Lys	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Ile	Gln	365	370	375
Ala	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Tyr	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Lys	380	385	390
Cys	Asp	Tyr	Glu	Asn	Val	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Thr	Pro	Leu	Glu	Tyr	395	400	405
Gly	Ala	Cys	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Lys	Phe	Gly	Glu	410	415	420
Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	His	Ser	Tyr	Phe	Trp	Pro	Leu	Glu	Trp	Thr	430	435	440
Ile	Pro	Ser	Arg	Asp	Asn	Asn	Lys	Cys	Tyr	Ala	Lys	Ile	Ile	Cys	Asn	445	450	455
Thr	Lys	Asp	Asn	Glu	Arg	Val	Val	Gly	Phe	His	Val	Leu	Gly	Pro	Asn	460	465	470
Ala	Gly	Glu	Val	Thr	Gln	Gly	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Cys	Gly	Leu	475	480	485
Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Gly	Ile	His	Pro	Val	Cys	Ala	490	495	500
Glu	Val	Phe	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile	510	515	520
Leu	Gln	Ala	Gly	Cys												525		

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 13
 Sekvenssin pituus: 715
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Säikeisyys: kaksisäikeinen
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssi:
 TAAATAAATA AATAA

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 14
 Sekvenssin pituus: 66
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Säikeisyys: kaksisäikeinen
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssi:
 CTAGCGCTCT GGGGCAAGCA TCCTCCAGGC TGGCTGCCAC CACCACCACC ACCATGATC 60
 TAGACT 66

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 15
 Sekvenssin pituus: 18
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 GGTCAGCACA AATTTCCA 18

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 16
 Sekvenssin pituus: 24
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 AAACACAAC TGAATGAAC AATT 24

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 17
 Sekvenssin pituus: 24
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 TCATTCCAAG TTGTGTTTGT GAAA 24

Sekvenssin ID-numero (tunnusnumero): 18
 Sekvenssin pituus: 18
 Sekvenssin tyyppi: nukleiinihappo
 Topologia: lineaarinen
 Molekyylylityyppi: toinen nukleiinihappo, synteettinen DNA
 Sekvenssin kuvaus:
 CATAGGATGC TCCAACAA 18

Patenttivaatimukset

1. Polynukleotidisekvenssi, joka koodaa fuusioproteiinin ja käsittää 5'-3'-suunnassa ja samassa avoimessa lukukehyksessä:

5

a) sekvenssin, joka koodaa clover yellow vein -viruksen Nuclear Inclusion a (Nla) -proteiinin;

b) sekvenssin, joka koodaa katkaisupeptidin, joka on tunnistettavissa ja katkaistavissa mainitulla clover yellow vein -viruksen Nla-proteinilla, jolloin mainittu
10 sekvenssi sisältää sekvenssin AsnCysSerPheGlnX, jossa X on Gly, Ala, Val tai Ser; ja

c) ainakin yhden sekvenssin, joka koodaa polypeptidin;

jolloin kohdan a) sekvenssi koodaa sekvenssiluettelossa sekvenssissä ID-numero
15 2 aminohapponumeroilla 4 – 437 esitetyn polypeptidin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se on DNA:ta.

20 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se on kaksisäikeinen.

4. Antisense-polynukleotidisekvenssi, joka vastaa jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukaista, olennaisesti kokonaista polynukleotidisekvenssiä.

25

5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että kohdan c) sekvenssi koodaa useamman kuin yhden polypeptidin ja että jokaisen koodatun polypeptidin väliin on koodattu ylimääräisiä katkaisusekvenssejä.

30

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että ylimääräiset katkaisusekvenssit ovat tunnistettavissa clover yellow vein – viruksen NIa:lla.
- 5 7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 – 4 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että kohdan c) sekvenssi koodaa ainoastaan yhden polypeptidin.
8. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, 10 t u n n e t t u siitä, että kohdan b) sekvenssi sisältyy kokonaan tai osittain joko sekvenssiin a) tai b) tai molempiin.
9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 – 7 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että kohdan b) sekvenssin koodaaman katkaisupeptidin ja kohdan c) sekvenssin koodaaman polypeptidin väliin on koodattu yksi tai useampia 15 aminohappotähteitä.
10. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että sen koodaaman fuusioproteiinin katkaisu kohdan a) sekvenssin koodaamalla NIa-proteiinilla antaa polypeptidin, jolla on ylimääräinen 20 N-pään aminohapposekvenssi, jonka päätetähte on glysiini, seriini tai alaniini.
11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että mainittu glysiini-, seriini- tai alaniinitähte voidaan haluttaessa poistaa so- 25 pivalla aminopeptidaasilla.
12. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että polypeptidin N-pään ja katkaisupeptidin C-pään väliin on koodattu proliinitähte.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että mitkä tahansa tähteistä, jotka sijaitsevat proliinitähteen jälkeen, proliinitähteen ja katkaisupeptidin välissä, voidaan katkaista aminopeptidaasi P:n vaikutuksella (3.4.11.9).

5

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että kun on suoritettu katkaisu proliinitähteeseen asti, proliinitähde voidaan poistaa proliini-iminopeptidaasin vaikutuksesta (3.4.11.5).

10 15. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että polypeptidin N-pään ja katkaisupeptidin C-pään väliin on koodattu alaniinitähde.

15 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että mitkä tahansa alaniinitähteen jälkeen sijaitsevista tähteistä voidaan katkaista aminopeptidaasi P:n vaikutuksella (3.4.11.9) ja alaniinitähteen katkaisu voidaan suorittaa alaniini-aminopeptidaasin katalyyttisellä vaikutuksella (3.4.11.14).

20 17. Patenttivaatimuksen 8 mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että kohdan b) sekvenssi sisältyy kokonaan kohtien a) ja b) sekvensseihin.

25 18. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että kohdan a) sekvenssi on esitetty sekvenssiluettelossa sekvenssissä ID-numero 1 nukleotidinumeroilla 10 – 1311.

25

19. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, tunnettu siitä, että se koodaa clover yellow vein -viruksen NIa-proteiinin, joka on esitetty sekvenssiluettelossa sekvenssissä ID-numero 1 nukleotidinumeroilla 10 – 1311.

30

20. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksessa 1 kohdassa a) määritelty sekvenssi on ainakin 90-%:isesti homologinen sekvenssin ID-numero 1 tähteiden 10 – 1311 kanssa.

5

21. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodaa lisäksi johtosekvenssin, joka sijaitsee ennen sekvenssiä a).

10 22. Vektori, joka sisältää jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukaisen polynukleotidisekvenssin.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on ekspressiovektori.

15

24. Patenttivaatimuksen 22 tai 23 mukaisella vektorilla transformoitu isäntä, joka ei ole ihminen.

20 25. Ilmentämisjärjestelmä, joka käsittää patenttivaatimuksen 23 mukaisella vektorilla transformoidun isännän, joka ei ole ihminen.

26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen ilmentämisjärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntä on Escherichia coli.

25 27. Polypeptidi, joka käsittää sekvenssissä ID-numero 2 tähteillä 4 – 437 esitetyn sekvenssin.

28. Polypeptidi, jolla on sekvenssissä ID-numero 2 tähteillä 4 – 437 esitetty sekvenssi.

30

29. Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että polypeptidin esiastemuoto katkaistaan clover yellow vein –viruksen NIa-proteiinilla.

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu esiaste on fuusioproteiini.

31. Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että polypeptidin esiastemuoto, joka sisältää sekvenssin AsnCysSerPheGlnX, jossa X on Gly, Ala, Val tai Ser, katkaistaan clover yellow vein –viruksen NIa-proteiinilla.

10

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen järjestelmä, t u n n e t t u siitä, että katkaisutuote on polypeptidin kypsä muoto.

33. Jonkin patenttivaatimuksen 1 – 21 mukaisen polynukleotidisekvenssin koodaama fuusioproteiini.

15

34. Patenttivaatimuksen 25 tai 26 mukainen ilmentämisjärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että sekvenssin a) koodaaman peptidin aikaansaamalla autolyysillä saadaan polypeptidi, jossa on ylimääräinen N-pään aminohapposekvenssi, jossa päätetähde on glysiini-, seriini- tai alaniinitähde, ja siitä, että isännässä on aminopeptidaasi, jolla mainittu N-pään tähde voidaan poistaa.

20

35. Patenttivaatimuksen 25 tai 26 mukainen ilmentämisjärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että sekvenssin a) koodaaman peptidin autolyysillä saadaan polypeptidi, jossa on ylimääräinen N-pään proliinitähde ja 0, 1 tai useita muita aminohappotähteitä, ja siitä, että mikä tahansa mainittu ylimääräinen aminohappotähde mainitun proliinin jälkeen voidaan poistaa aminopeptidaasi P:llä (3.4.11.9).

25

36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen ilmentämisjärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että proliinitähteeseen asti toteutetun katkaisun jälkeen proliinitähde voidaan siten poistaa proliini-iminopeptidaasin vaikutuksella (3.4.11.5).

30

37. Patenttivaatimuksen 25 tai 26 mukainen ilmentämisjärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että sekvenssin a) koodaaman peptidin aikaansaamalla autolyysillä saadaan polypeptidi, jossa on ylimääräinen N-pään alaniinitähde ja 0, 1 tai useita muita aminohappotähteitä, ja siitä, että mikä tahansa mainittu ylimääräinen aminohappotähde mainitun alaniinin jälkeen voidaan poistaa aminopeptidaasi P:llä (3.4.11.9) ja alaniinitähde voidaan poistaa alaniini-aminopeptidaasin (3.4.11.14) vaikutuksella.
- 10 38. Jonkin patenttivaatimuksen 1 – 20 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että kohdan c) sekvenssi on valittu seuraavien joukosta:
- (a) sekvenssin ID-numero 12 aminohapponumeroiden 1 – 526 mukaiset aminohapot käsittävän polypeptidin koodaava polynukleotidisekvenssi edellyttäen, että
- 15 polynukleotidisekvenssin koodaama polypeptidi kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia ja hapettunutta glutationia;
- (b) sekvenssin ID-numero 12 aminohapponumeroiden 1 – 526 kanssa vähintään 55-%:isesti homologisen polypeptidin koodaava polynukleotidisekvenssi edellyttäen, että polynukleotidisekvenssin koodaama polypeptidi kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia ja hapettunutta glutationia;
- 20 (c) sekvenssin ID-numero 12 aminohapponumeroiden 1 – 526 kanssa yli 70-%:isesti homologisen polypeptidin koodaava polynukleotidisekvenssi edellyttäen, että polynukleotidisekvenssin koodaama polypeptidi kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia ja hapettunutta glutationia;
- 25 (d) sekvenssin ID-numero 12 aminohapponumeroiden 1 – 526 kanssa yli 80-%:isesti homologisen polypeptidin koodaava polynukleotidisekvenssi edellyttäen, että polynukleotidisekvenssin koodaama polypeptidi kykenee pelkistämään dikloori-indofenolia ja hapettunutta glutationia;
- 30

(e) jonkin kohdan (a) – (d) mukainen polynukleotidisekvenssi, jossa koodaava sekvenssi käsittää sekvenssissä ID-numero 11 osoitetun nukleotidisekvenssin 70 – 1647;

5

(f) kohdan (a) mukainen polynukleotidisekvenssi, joka koodaa polypeptidin, jolla on sekvenssin ID 12 sekvenssi -23 – 526;

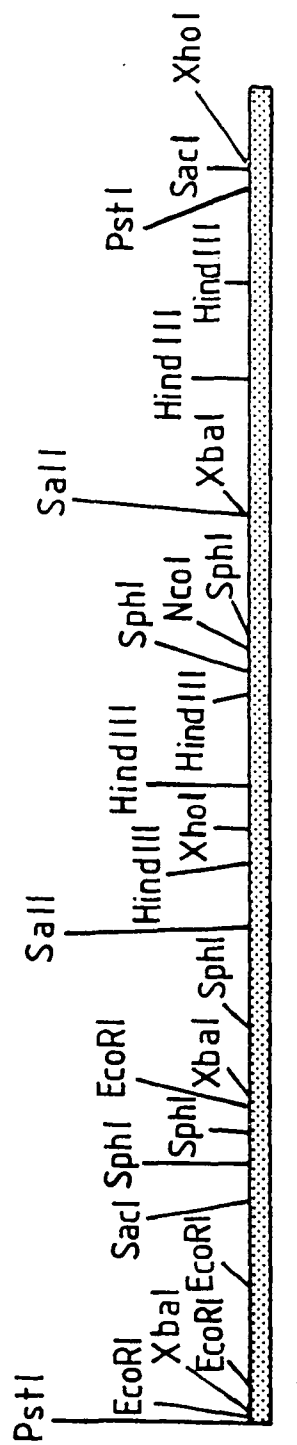
(g) DNA, joka hybridisoituu jonkin kohdan (a) – (f) mukaisen polynukleotidisekvenssin kanssa ja jossa vastaava koodaava juoste koodaa polypeptidin, jolla on pelkistävää aktiivisuutta;

10

(h) kohdan (g) mukainen DNA, jolloin hybridisaatio-olosuhteissa käytetään 6x SSC:tä 60 – 70 °C olevassa lämpötilassa.

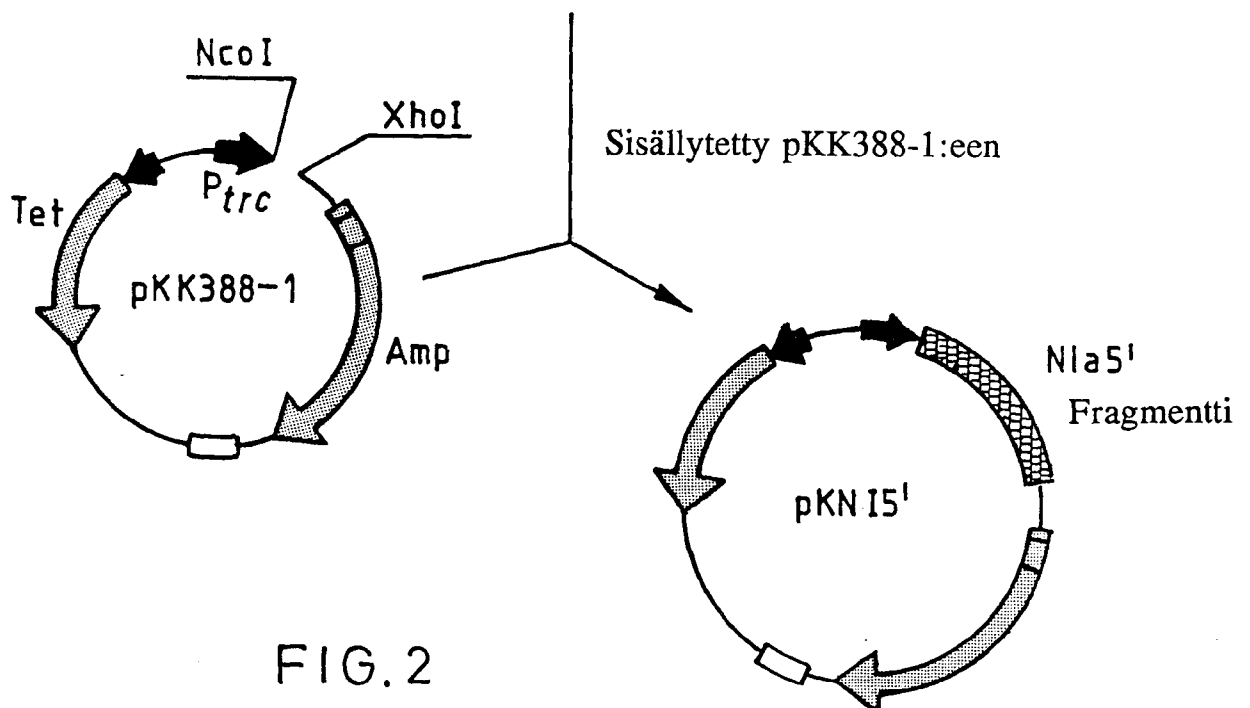
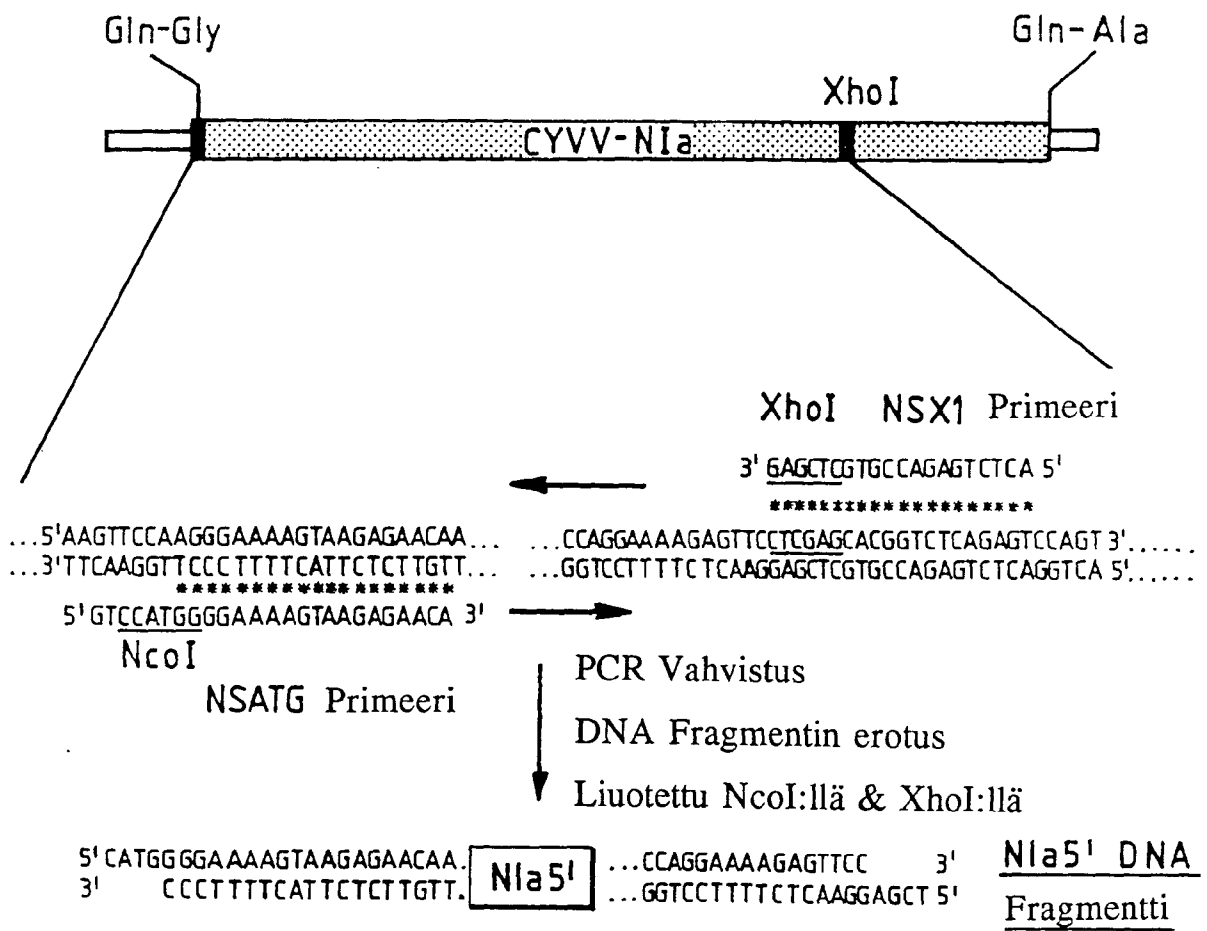
15

39. Patenttivaatimuksen 38 mukaisen polynukleotidisekvenssin koodaama fuusio-proteiini.



Määritetty nukleotidisekvenssi

FIG.1



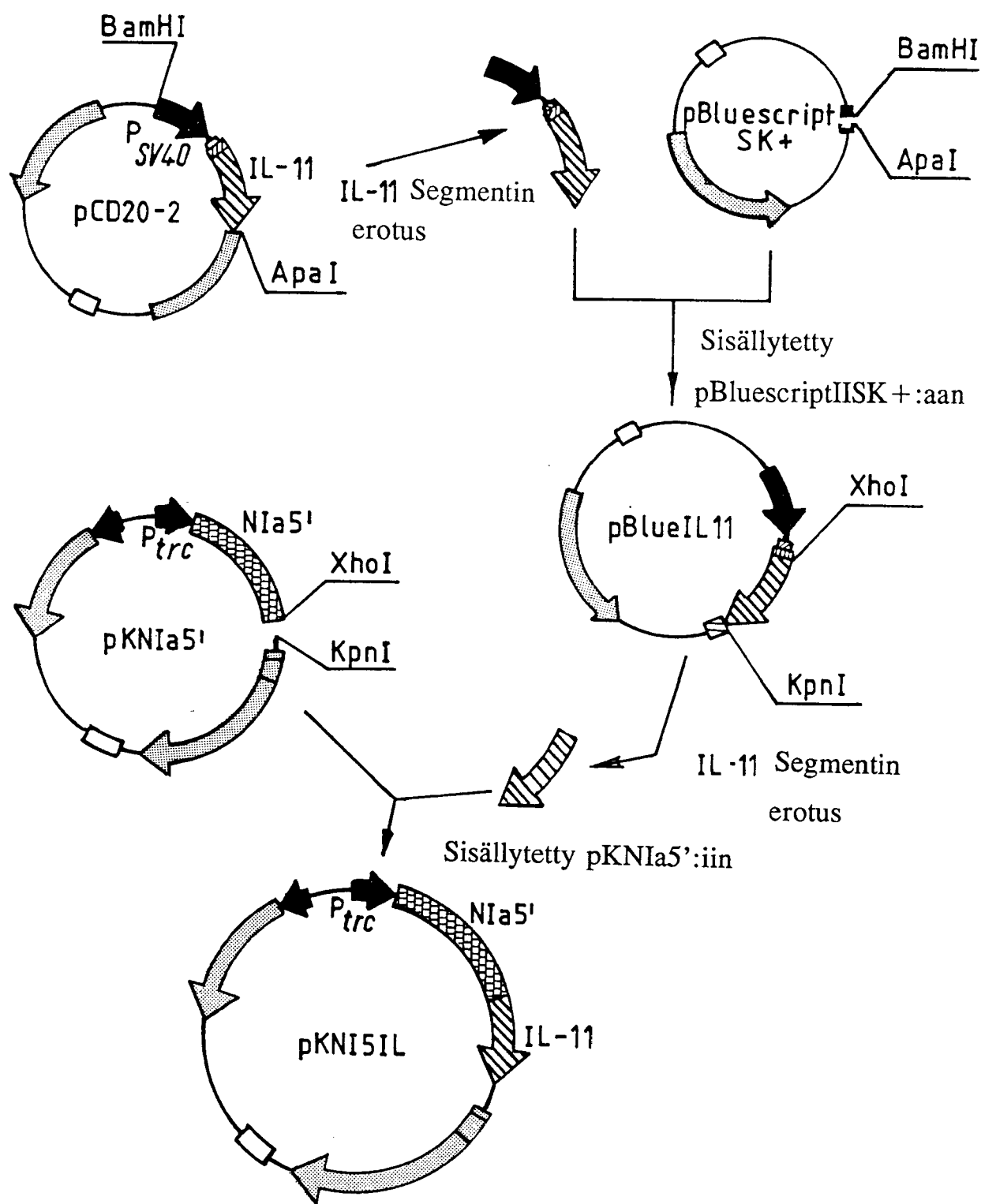


FIG. 3

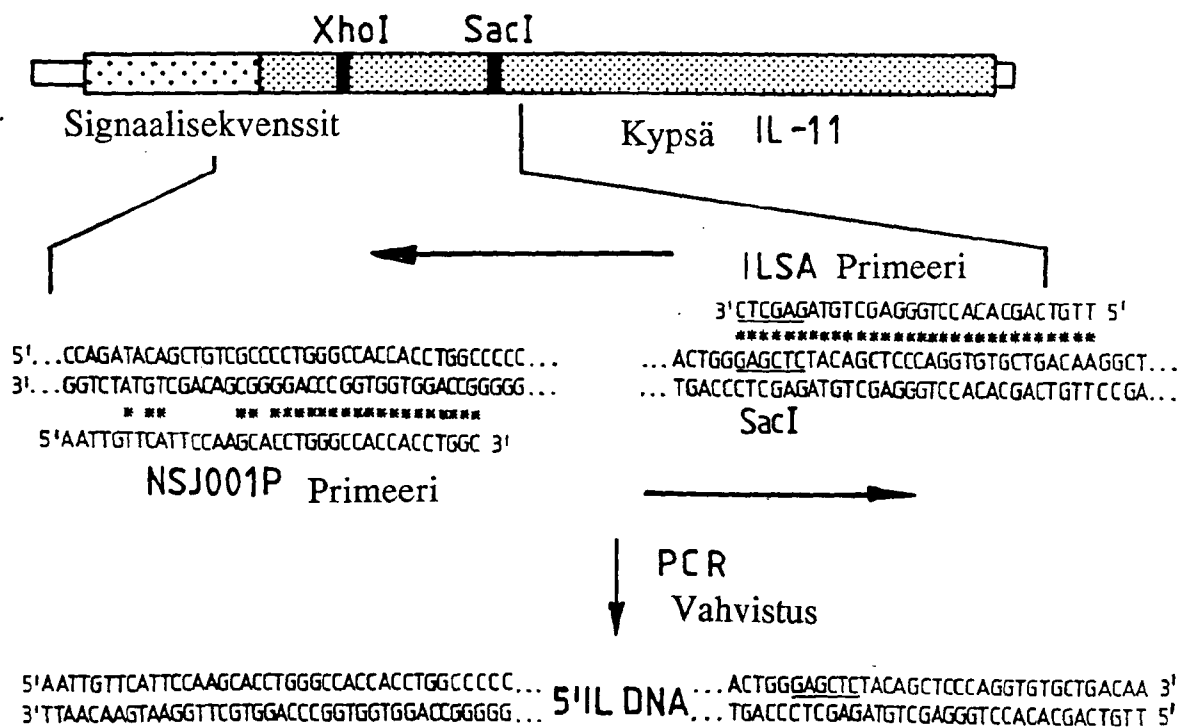
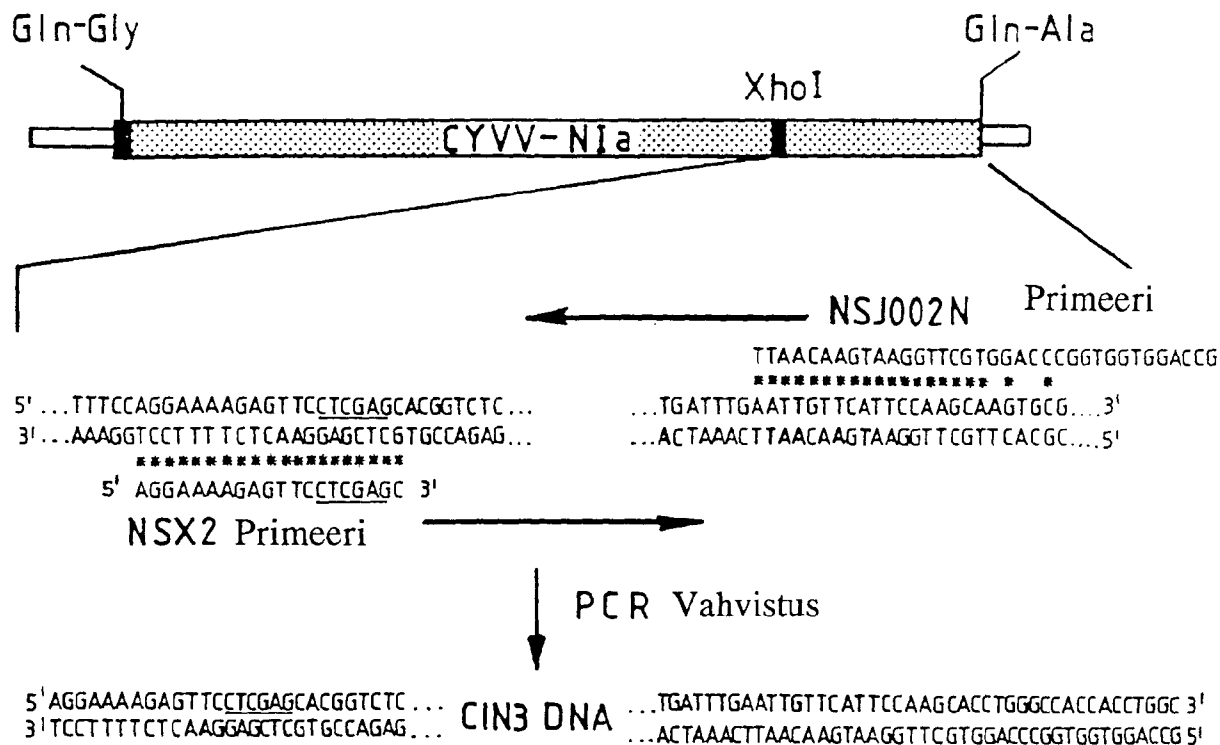


FIG.4

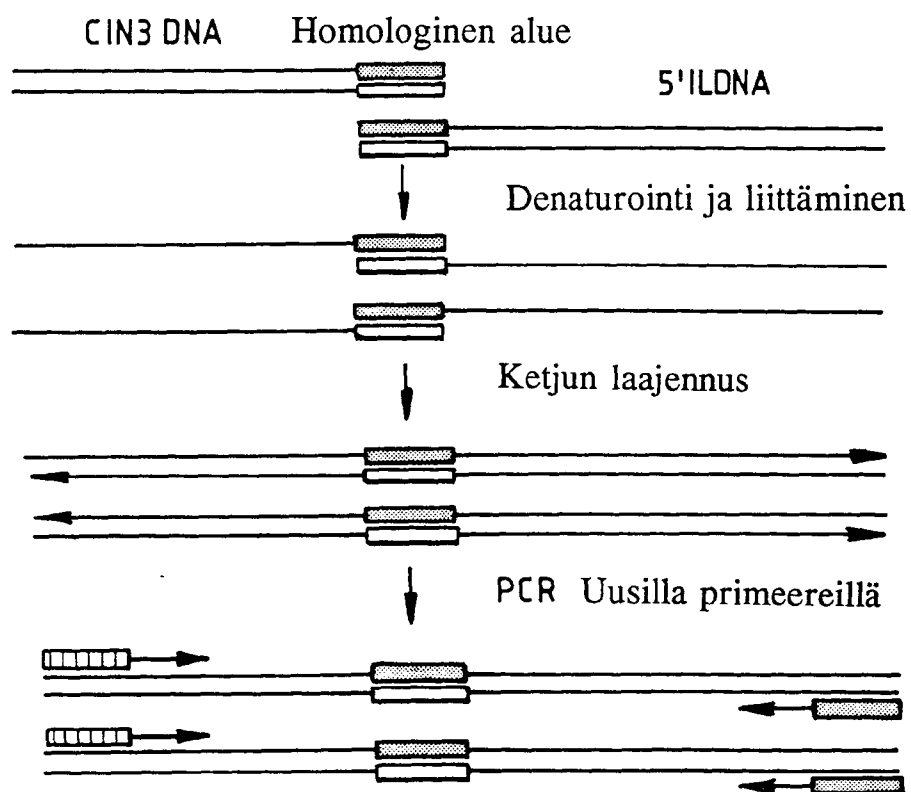
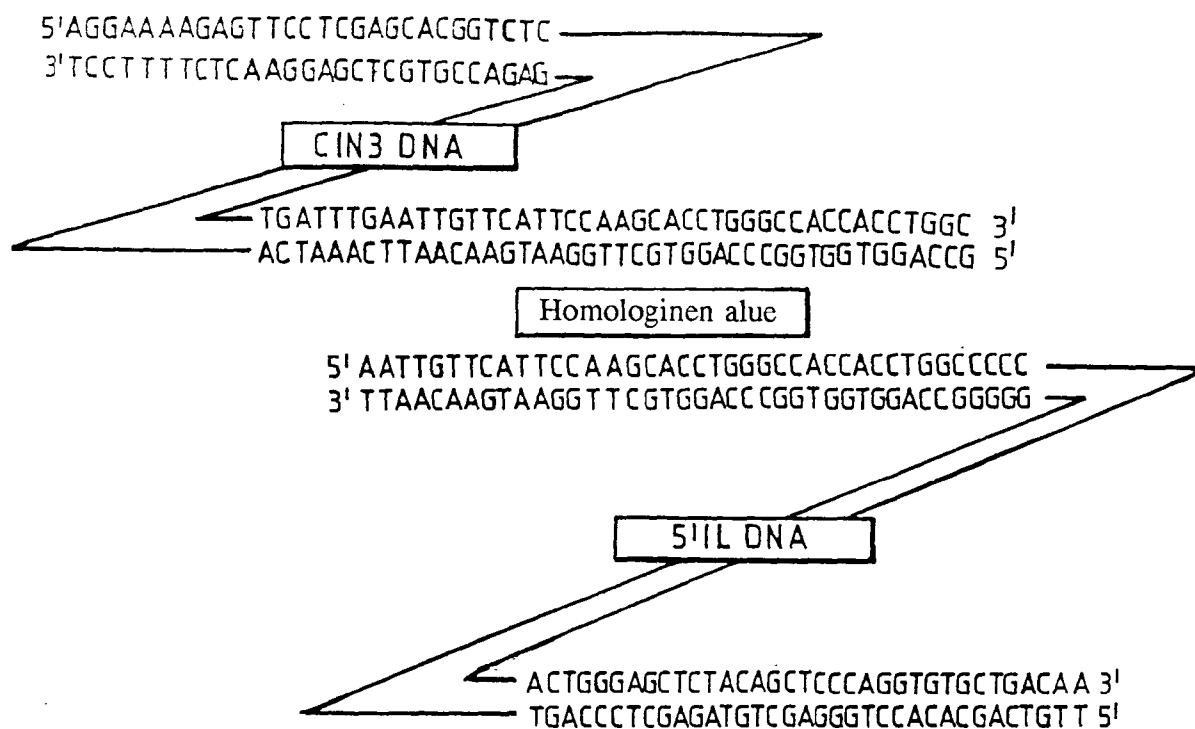


FIG.5

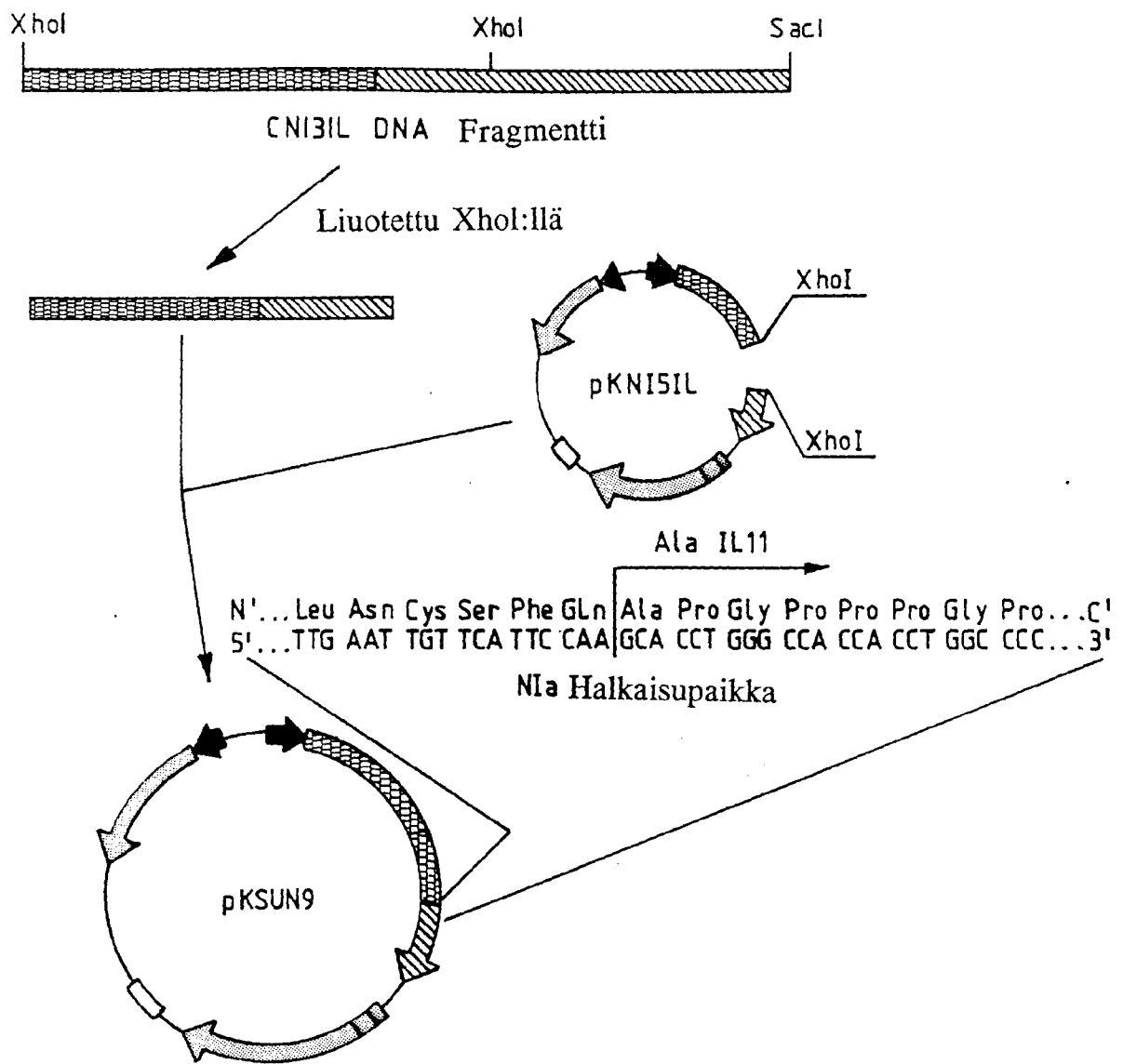


FIG.6

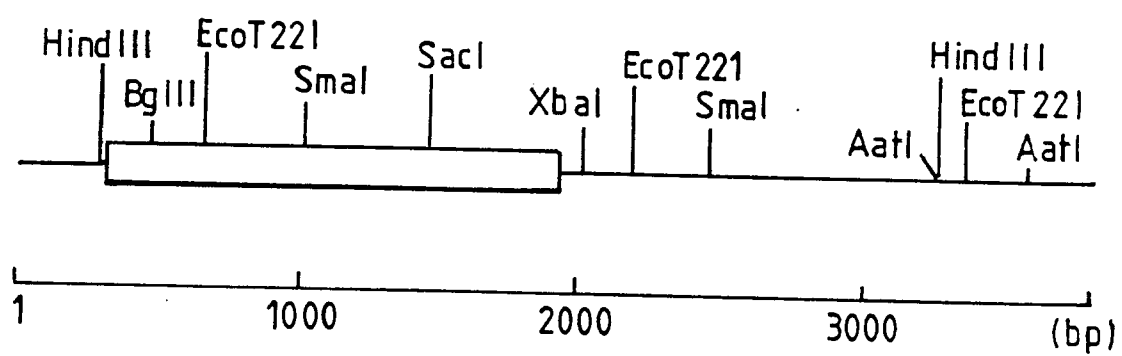
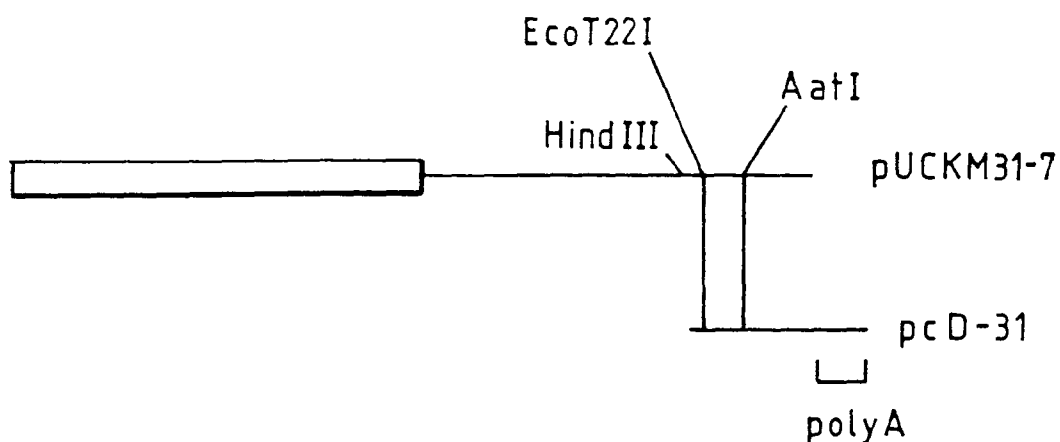


FIG.7



pUCKM31-7: CATATTCAGTTTATTATTATTATTAAATTGTTTTTTC TCC

pcD-31:

AAGTCCACCAGTCTCTGAAATTAGAACAGTAGGCGGTATGAGATAATCAG

.

GCCTAATCATGTTGTGATTCTCTTTTCTTAGTGGAGTGGAAATGTTCTATC

|||||

. CCTAATCATGTTGTGATTCTCTTTTCTTAGTGGAGTGGAAATGTTCTATC

CCCACAAGAAGGATTATATCTTATAGACTTGTCTTGTTTCAGATTCTGTAT

|||||

CCCACAAGAAGGATTATATCTTATAGACTTGTCTTGTTTCAGATTCTGTAT

TTACCCATTTTATTGAAACATATACTAAGTTCATGTATTTTGTACAA

|||||

TTACCCATTTTATTGAAACATATACTAAGTTCATGTATTTTGTACAA

ATCTTCTGAAAAAAAAACAAAACAATGTGAAACATTAAAATTAAAAGGCAT

|||||

ATCTTCTGAAAAAAAAACAAAACAATGTGAAACATTAAAATTAAAAGGCAT

TAATA

TAATAATAA.

FIG.8

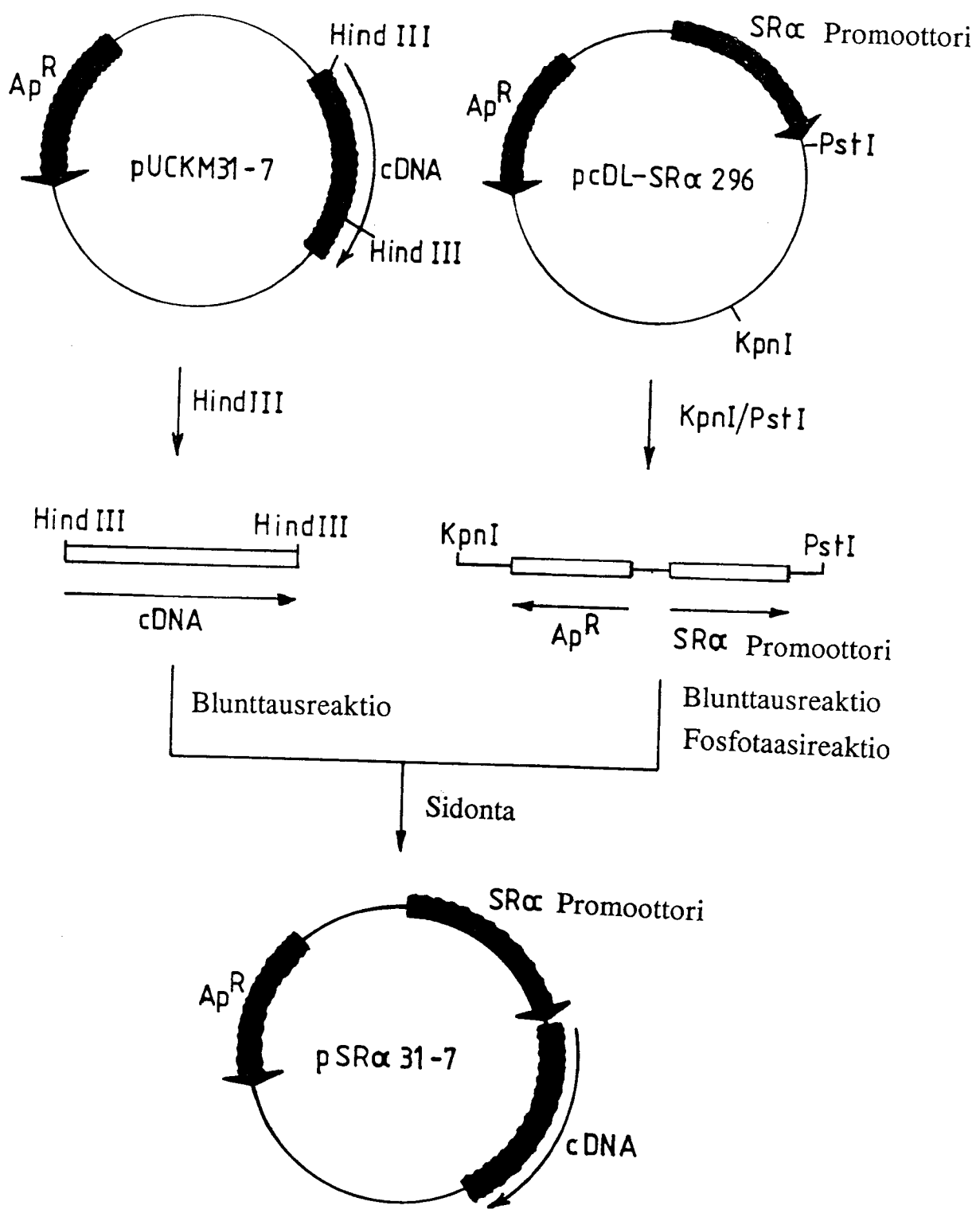


FIG.9

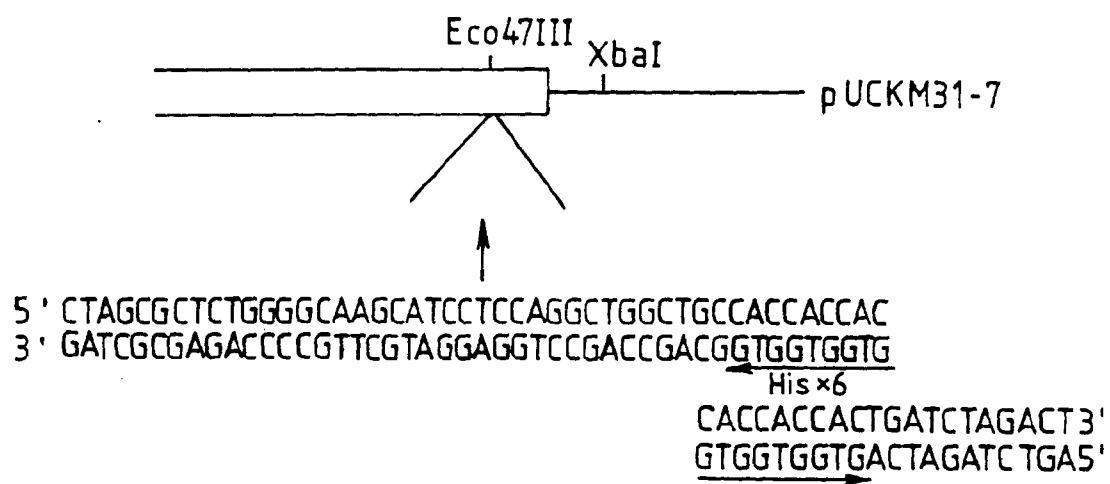


FIG. 10

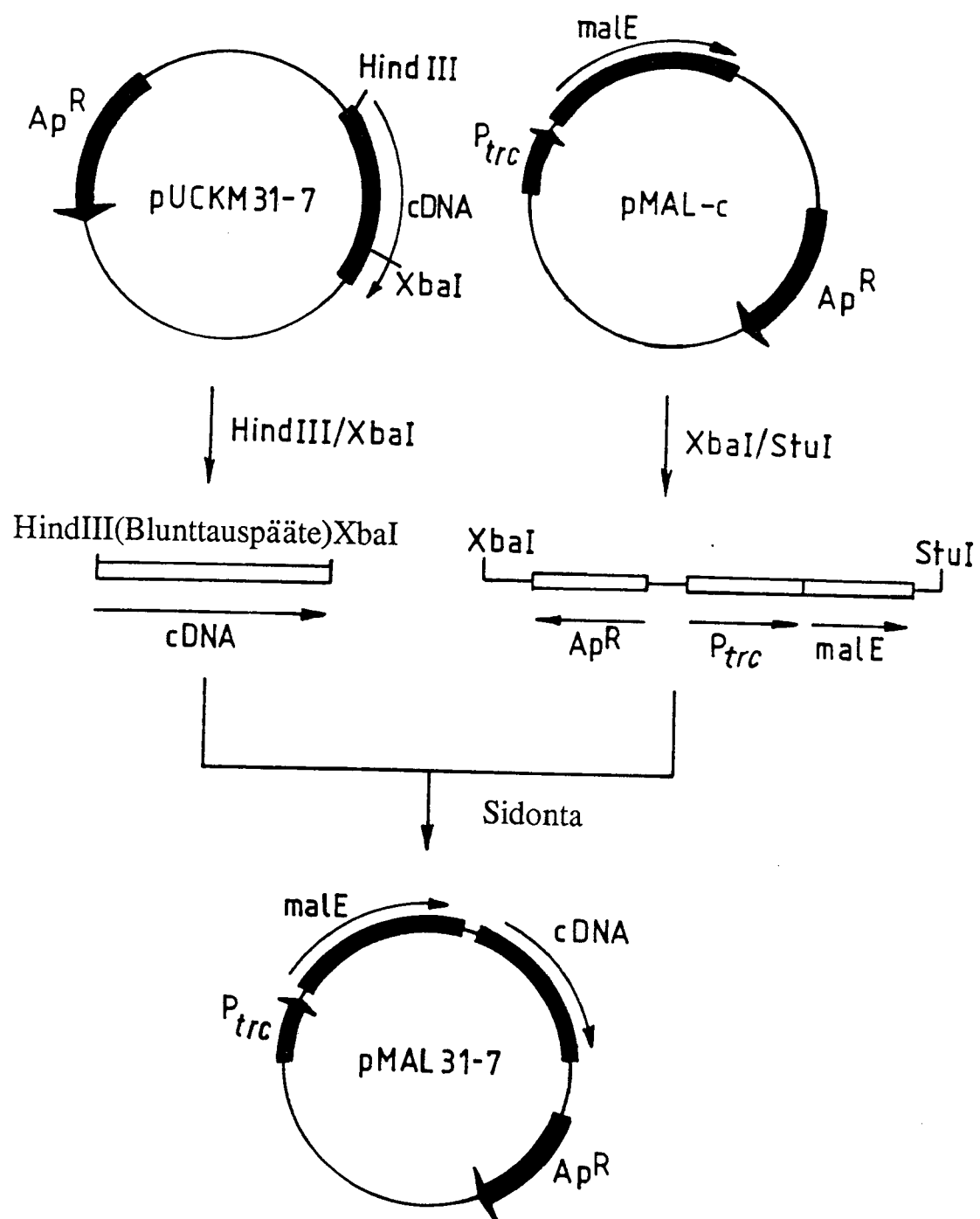


FIG.11

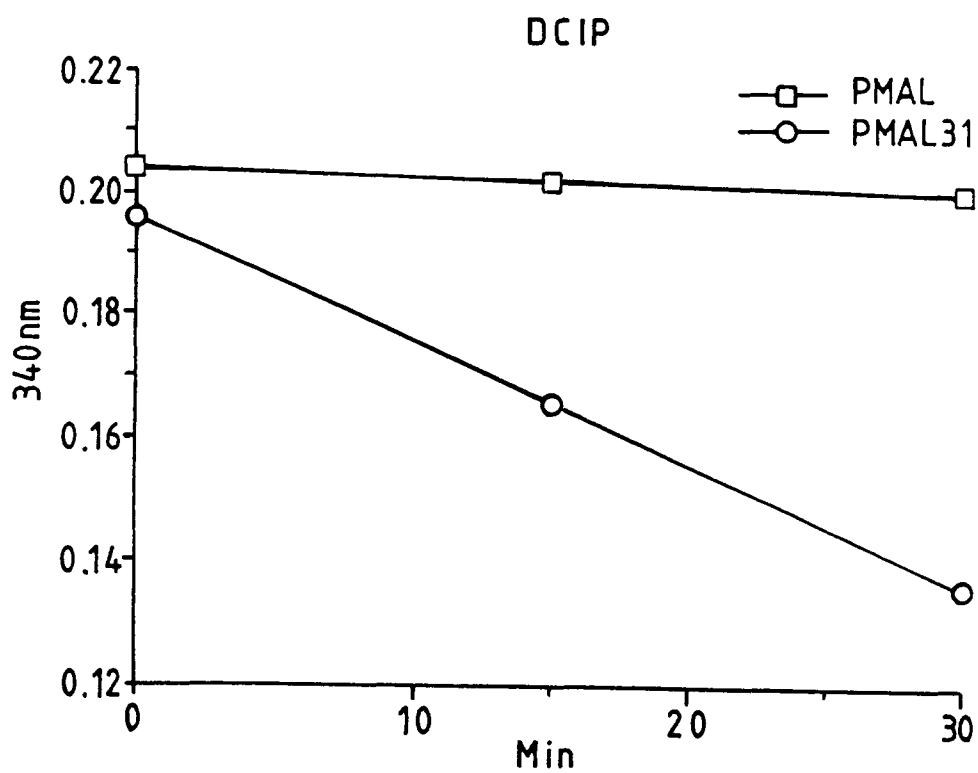
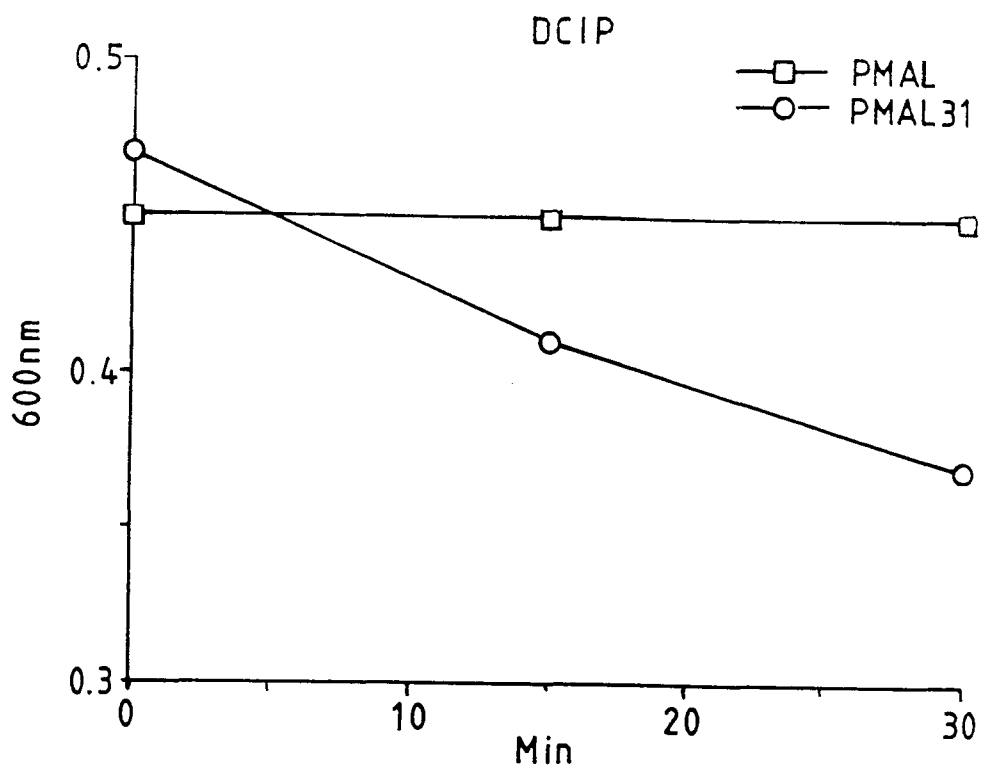


FIG.12

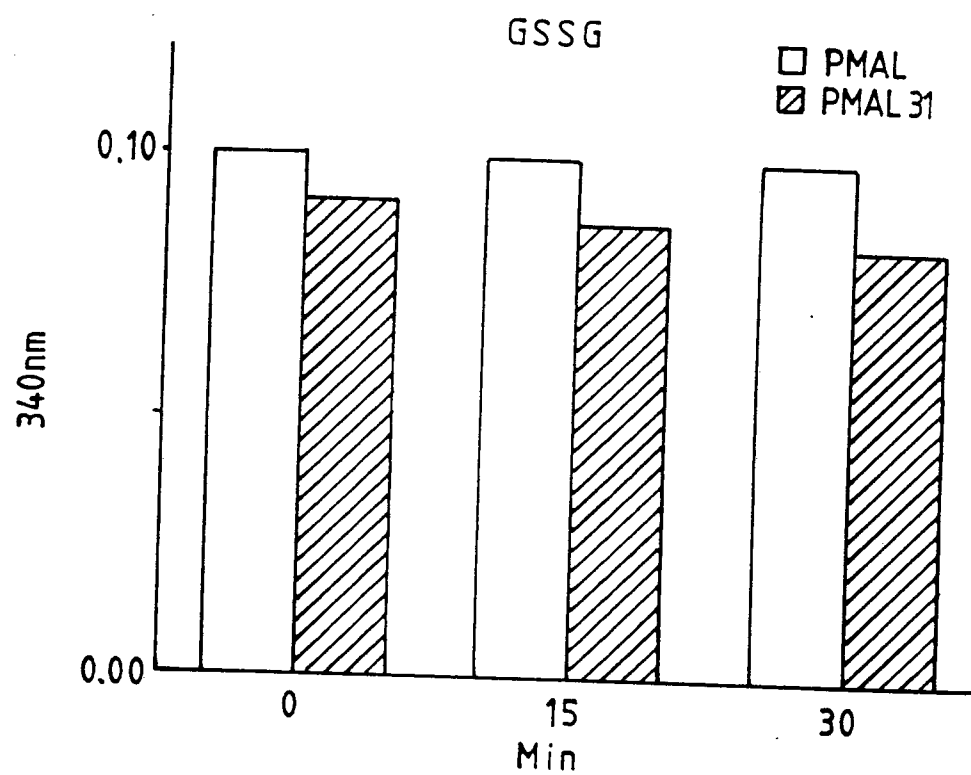
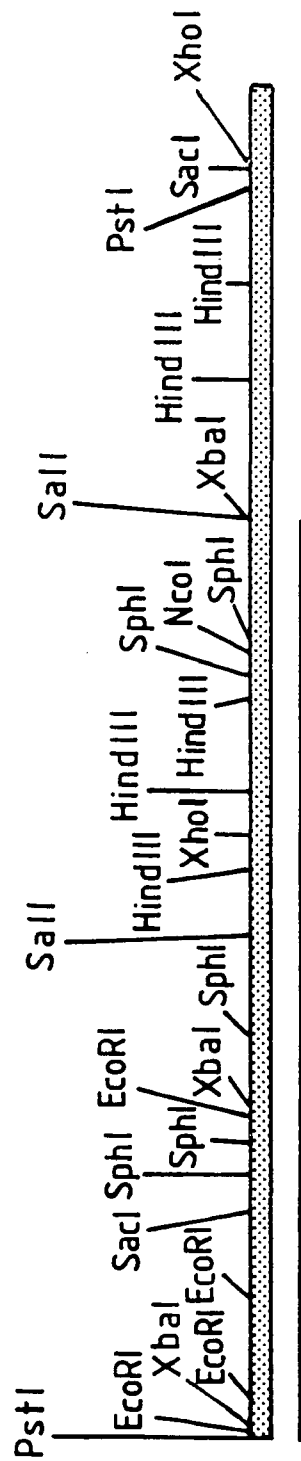


FIG. 13



Määritetty nukleotidisekvenssi

FIG.1

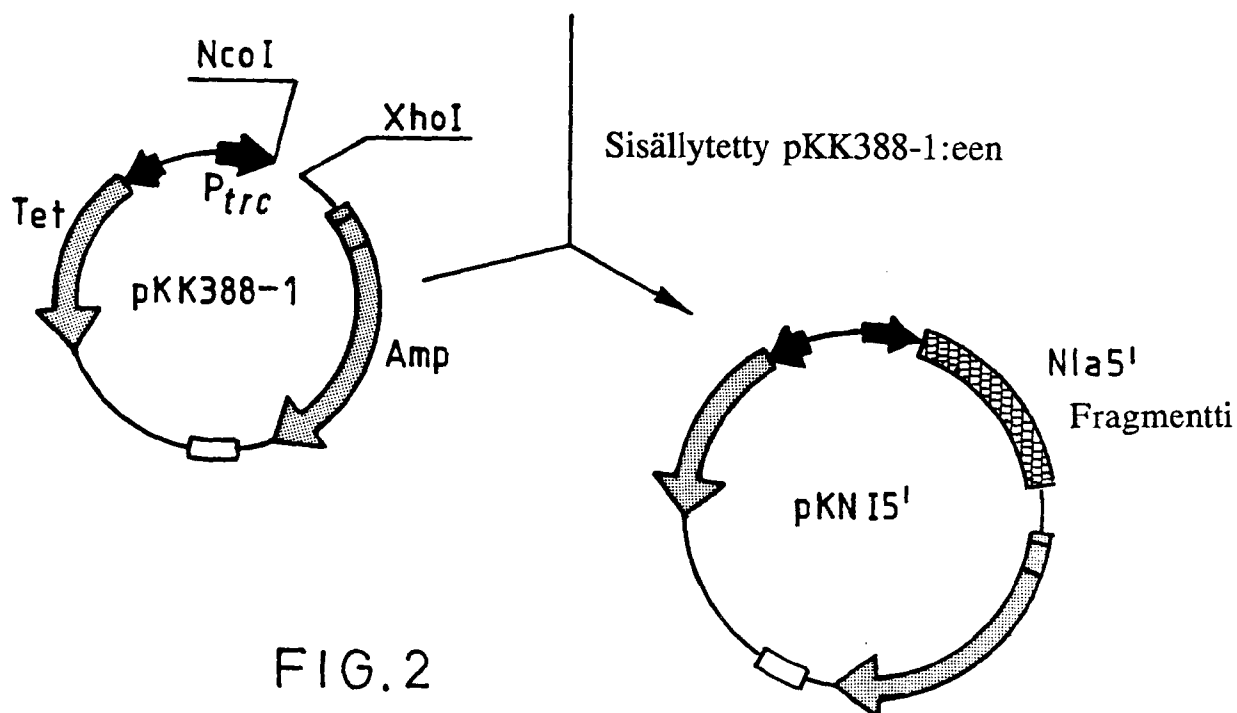
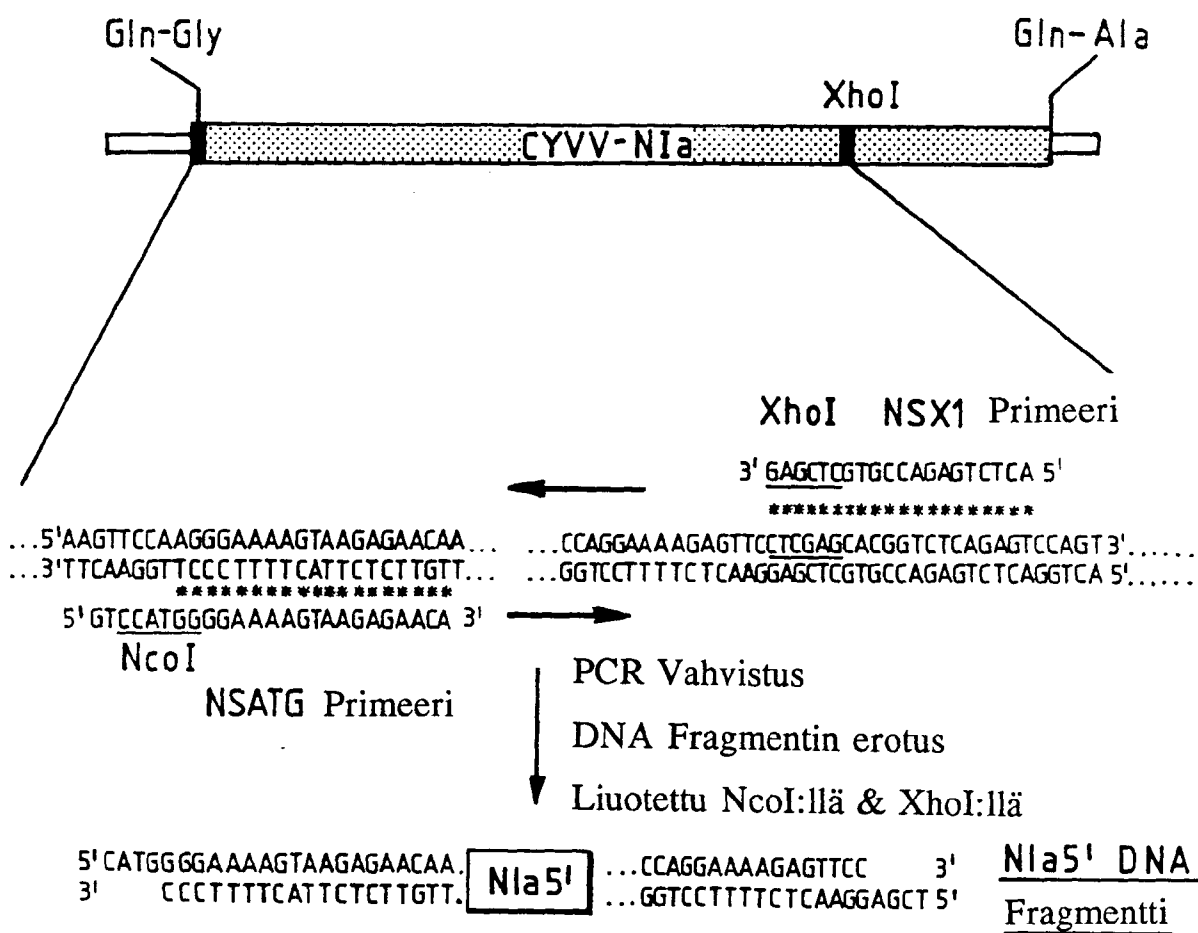


FIG.2

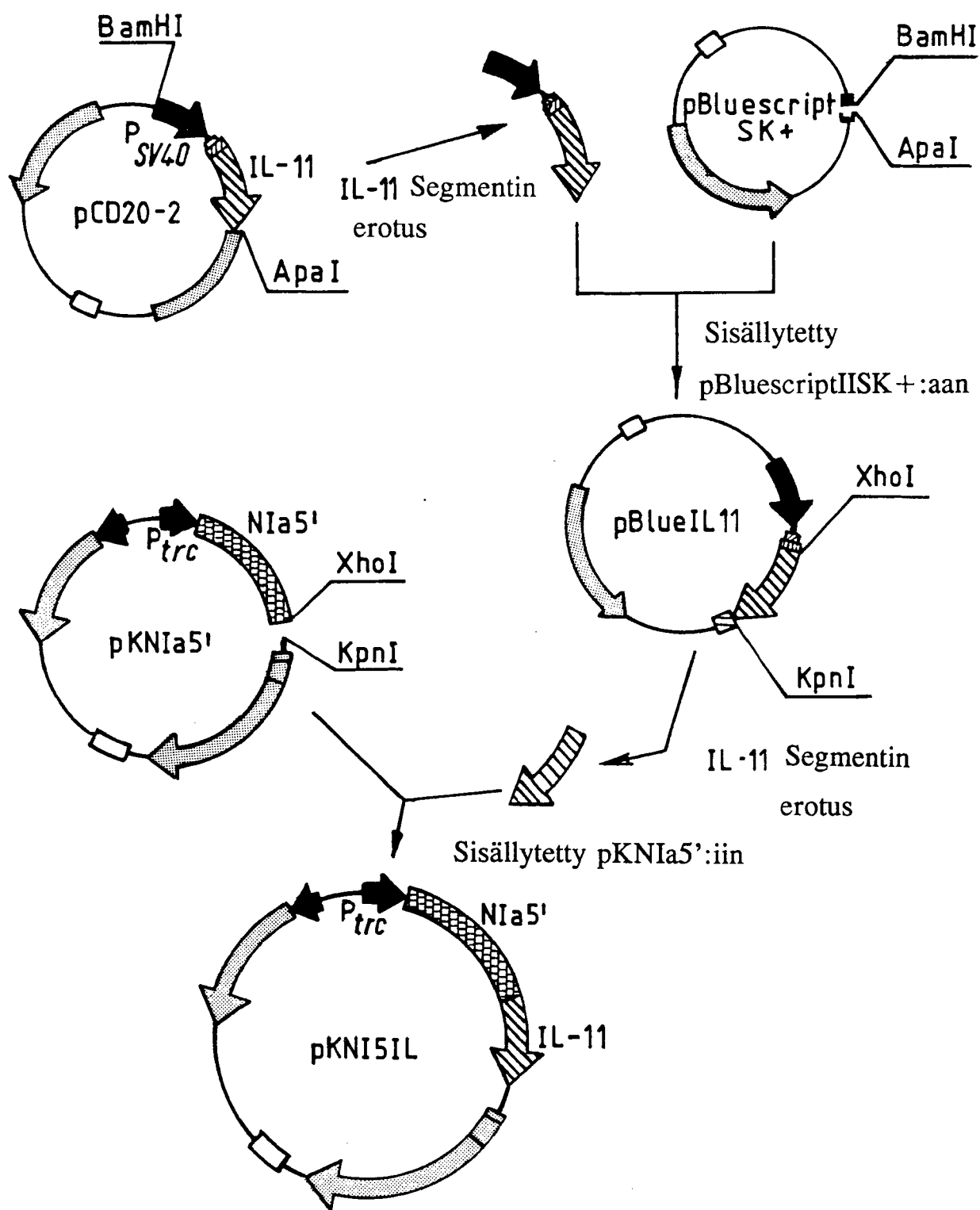


FIG. 3

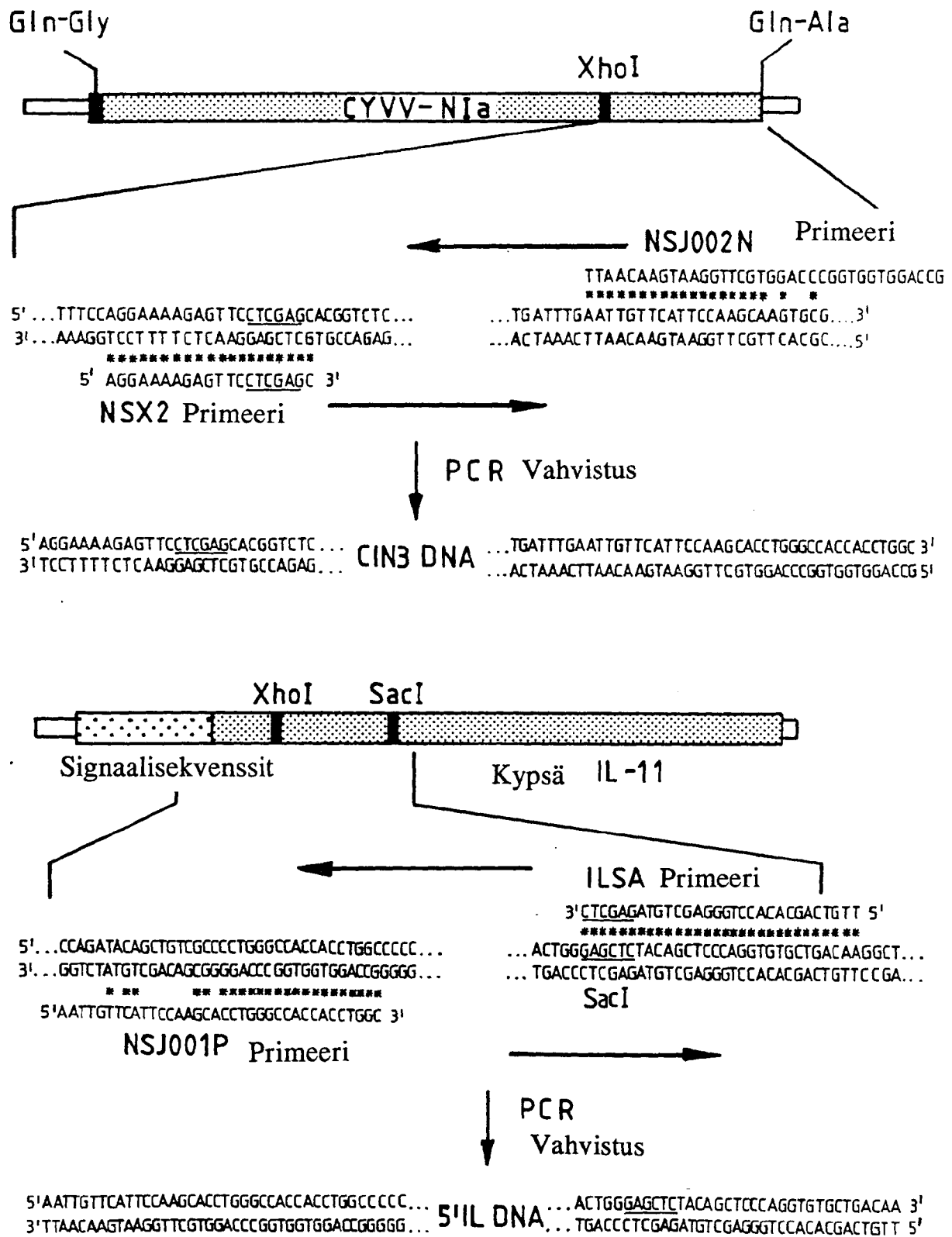


FIG. 4

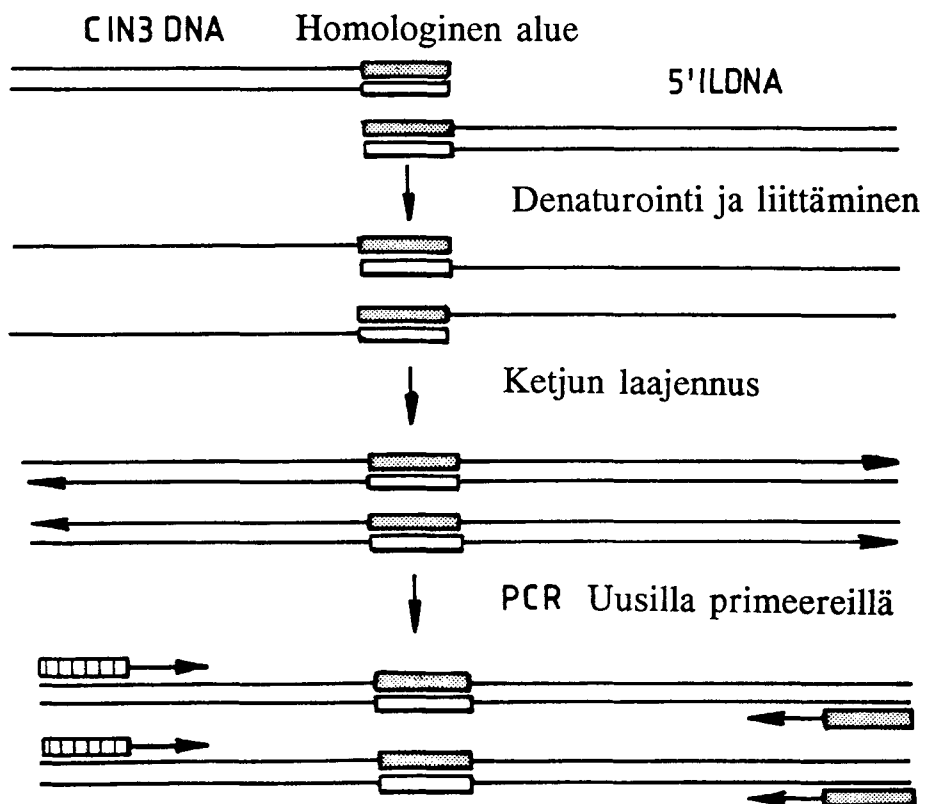
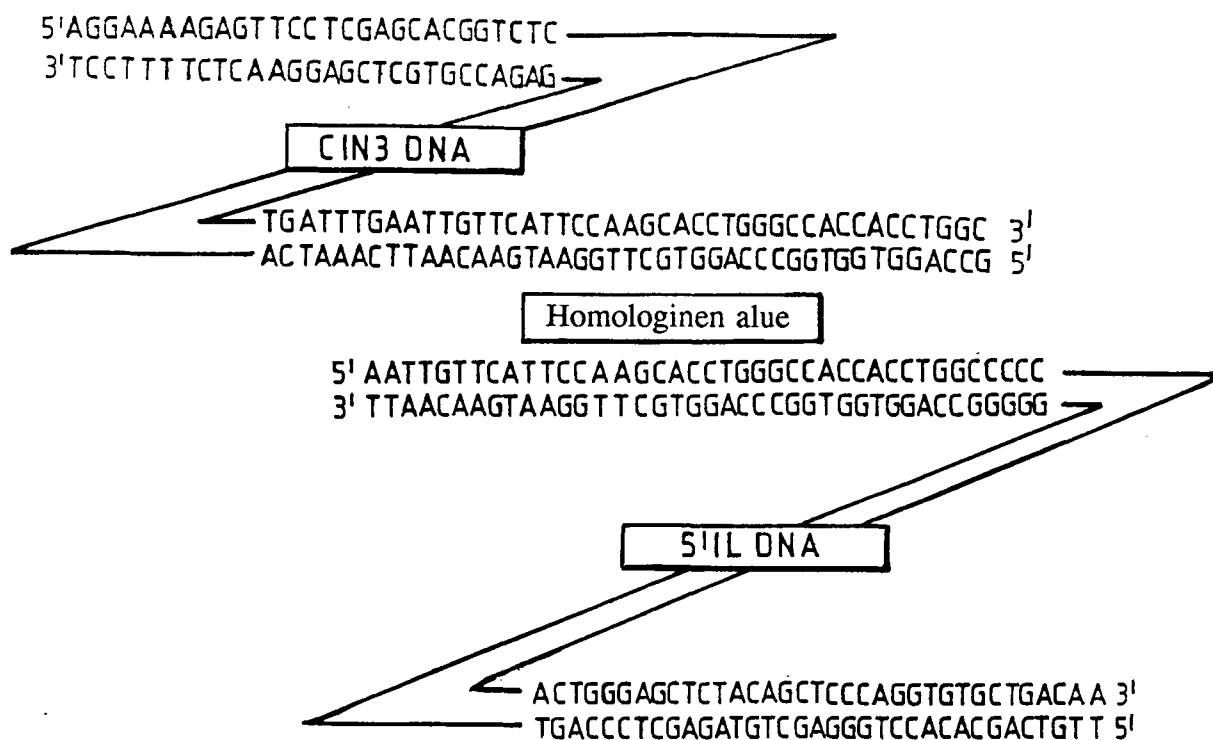


FIG. 5

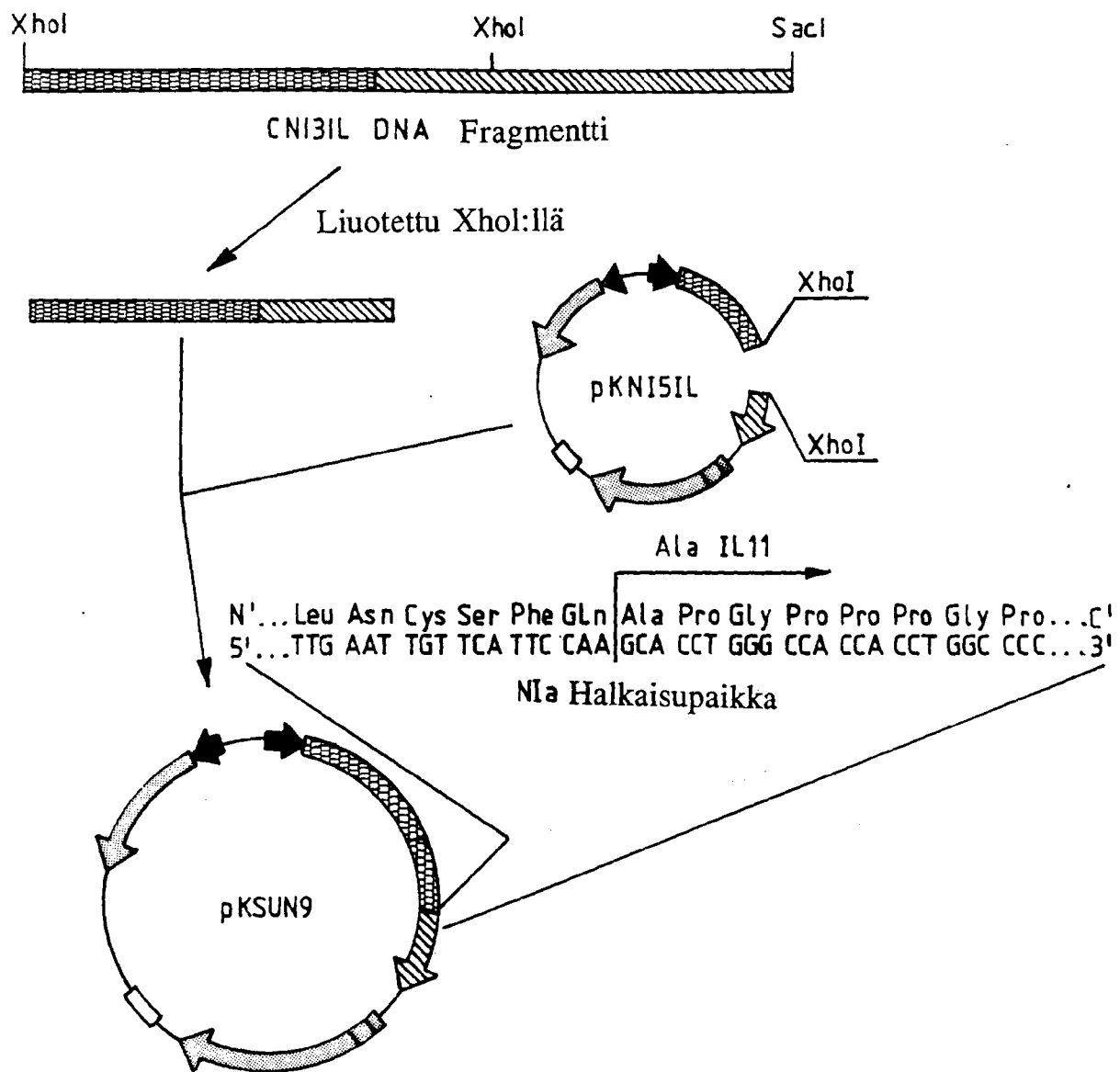


FIG.6

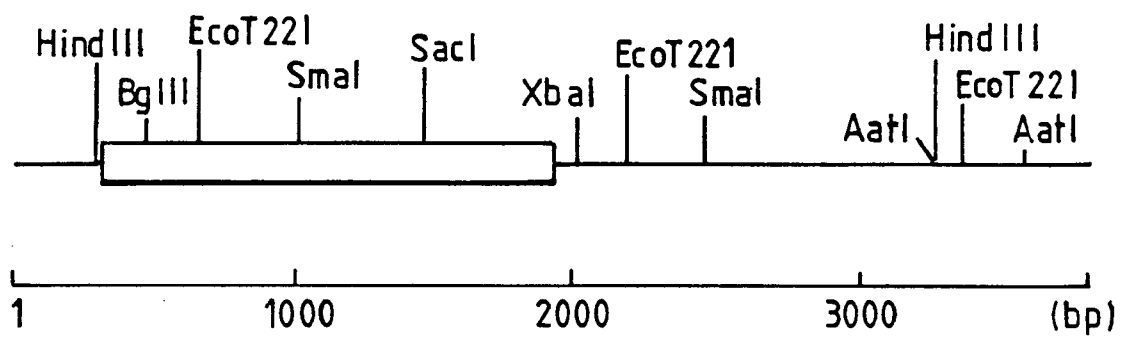
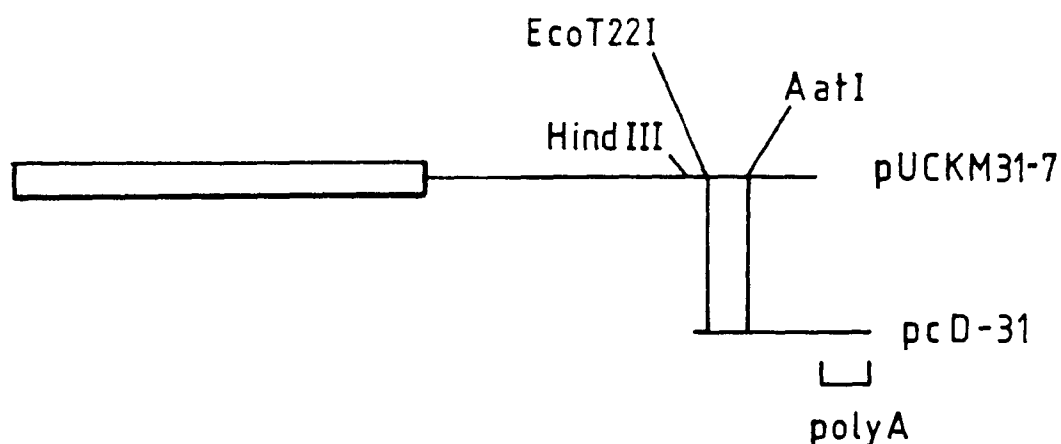


FIG.7



pUCKM31-7:..... CATATTCAGTTTATTATTTATTTAATTTGTTTTTCTCC

pcD-31:

AAGTCCACCAGTCTCTGAAATTAGAACAGTAGGCGGTATGAGATAATCAG

.....

GCCTAATCATGTTGTGATTCTCTTTTCTTAGTGGAGTGGAAATGTTCTATC

|||||
 . CCTAATCATGTTGTGATTCTCTTTTCTTAGTGGAGTGGAAATGTTCTATC

CCCACAAGAAGGATTATATCTTATAGACTTGTCTTGTTCAGATTCTGTAT

|||||
 CCCACAAGAAGGATTATATCTTATAGACTTGTCTTGTTCAGATTCTGTAT

TTACCCATT TTATTGAAACATATACTAAGTTCATGTATTTTGT TACAA

|||||
 TTACCCATT TTATTGAAACATATACTAAGTTCATGTATTTTGT TACAA

ATCTTCTGAAAAAAAAACAAAACAATGTGAAACAT TAAAT TAAAAGGCAT

|||||
 ATCTTCTGAAAAAAAAACAAAACAATGTGAAACAT TAAAT TAAAAGGCAT

TAATA.....

TAATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.

FIG.8

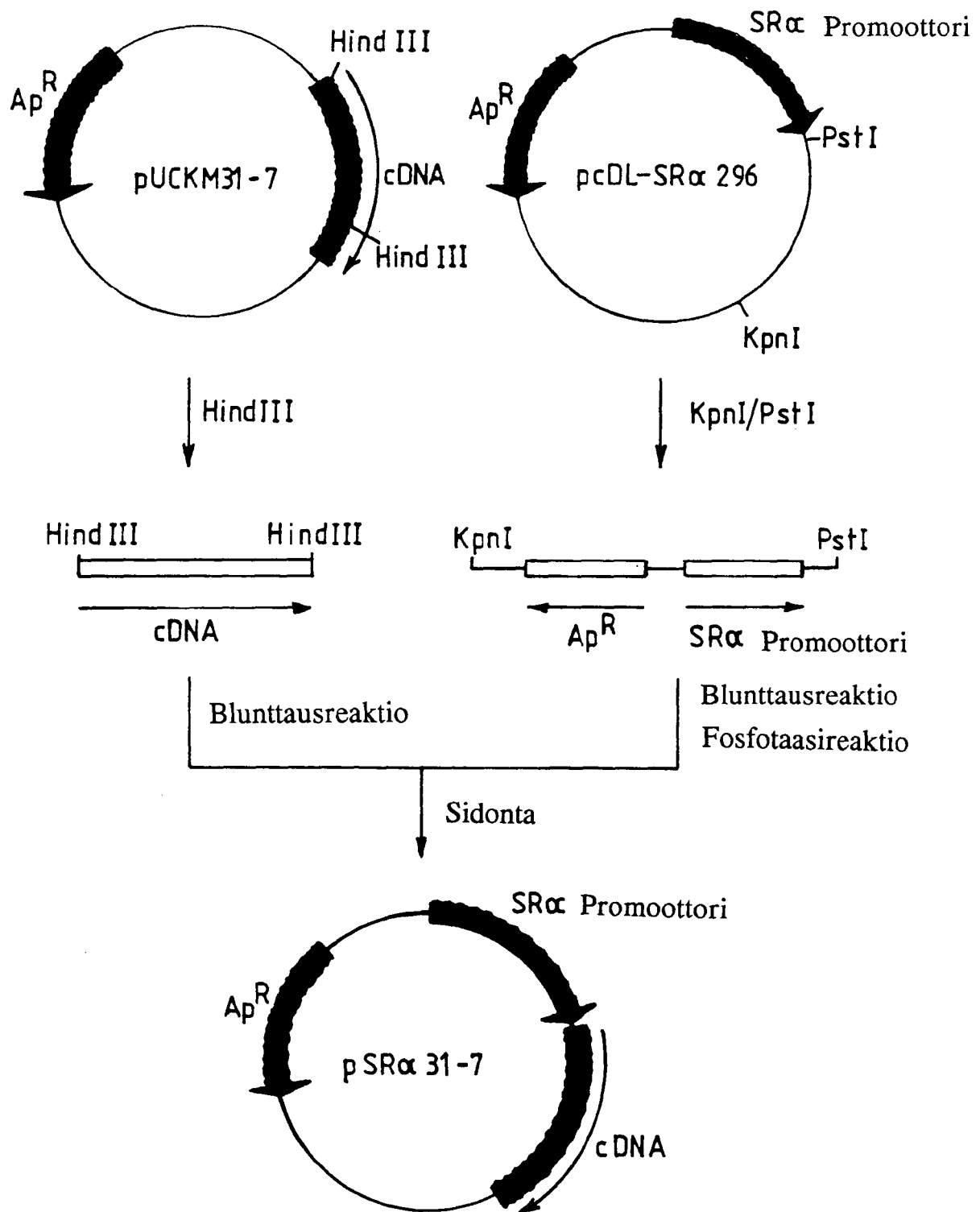


FIG.9

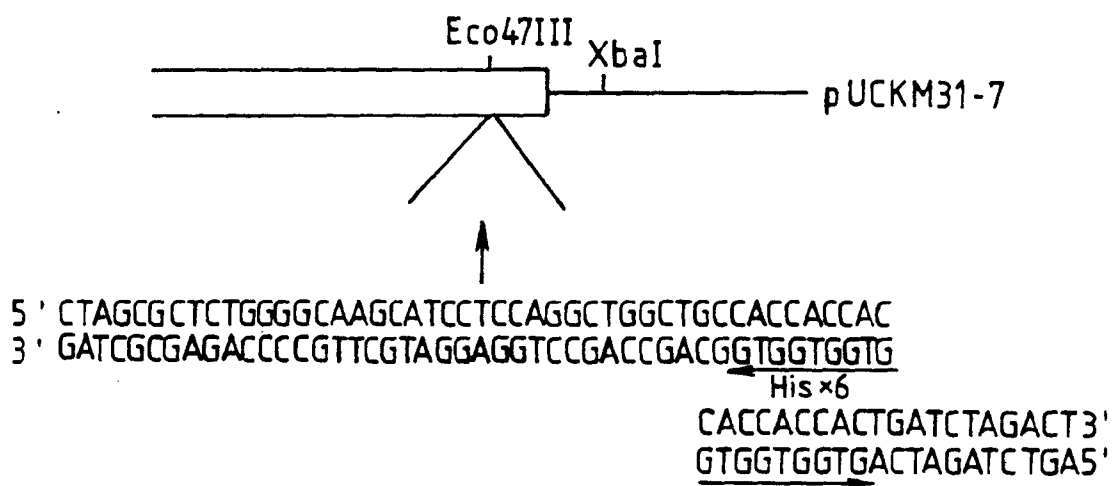


FIG. 10

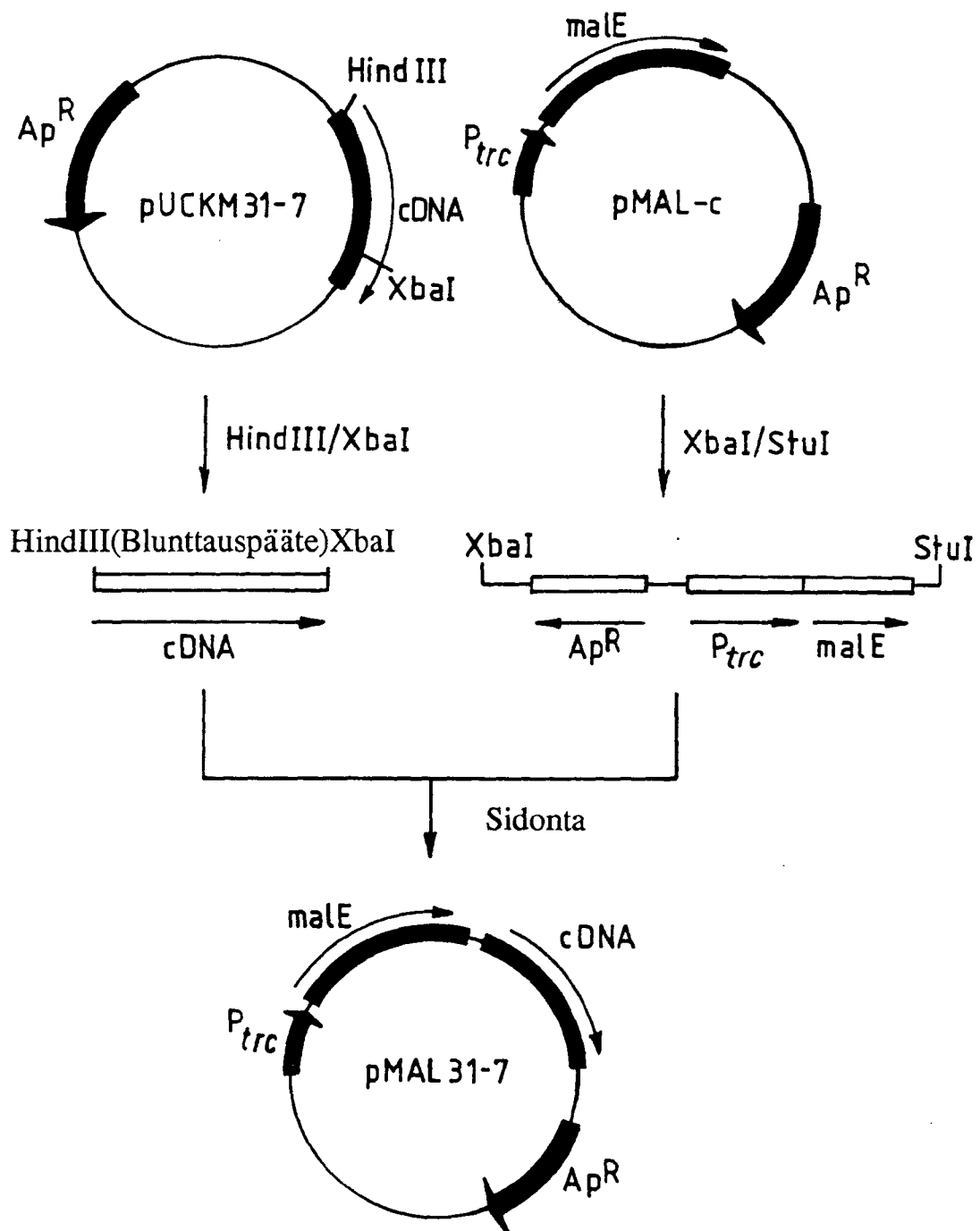


FIG.11

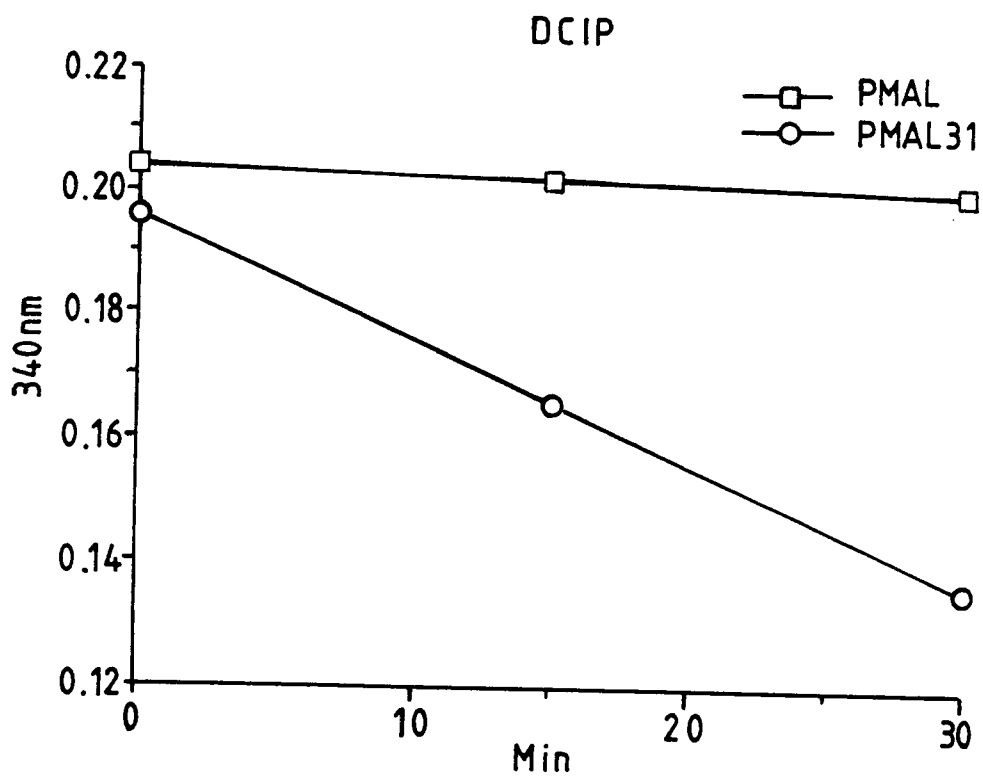
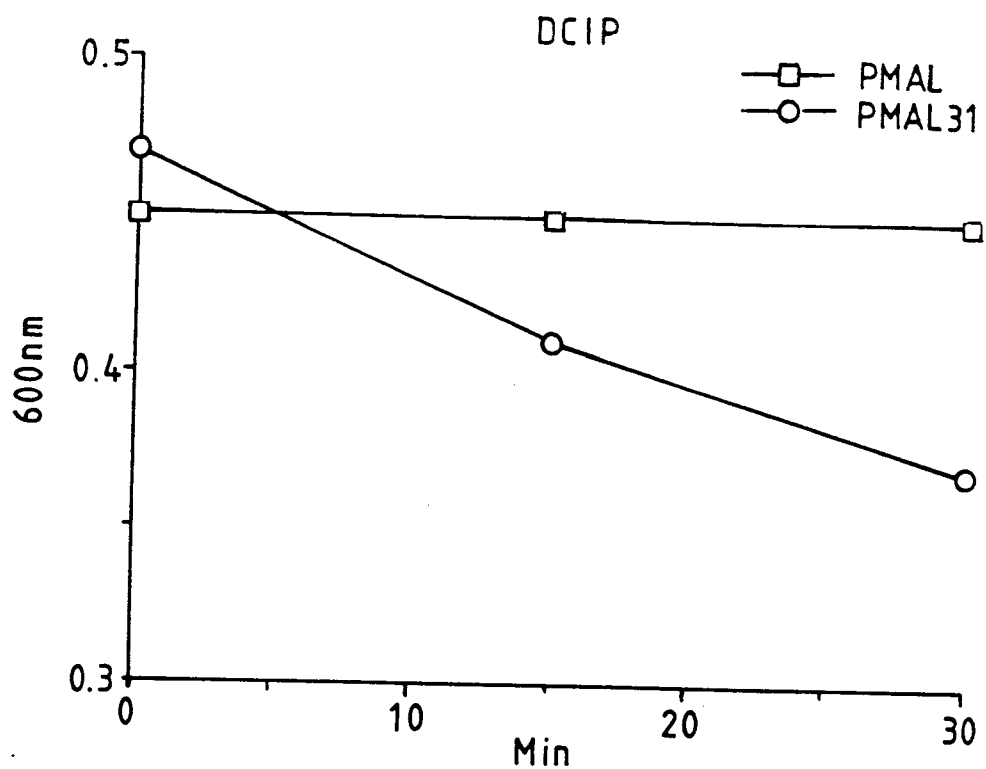


FIG.12

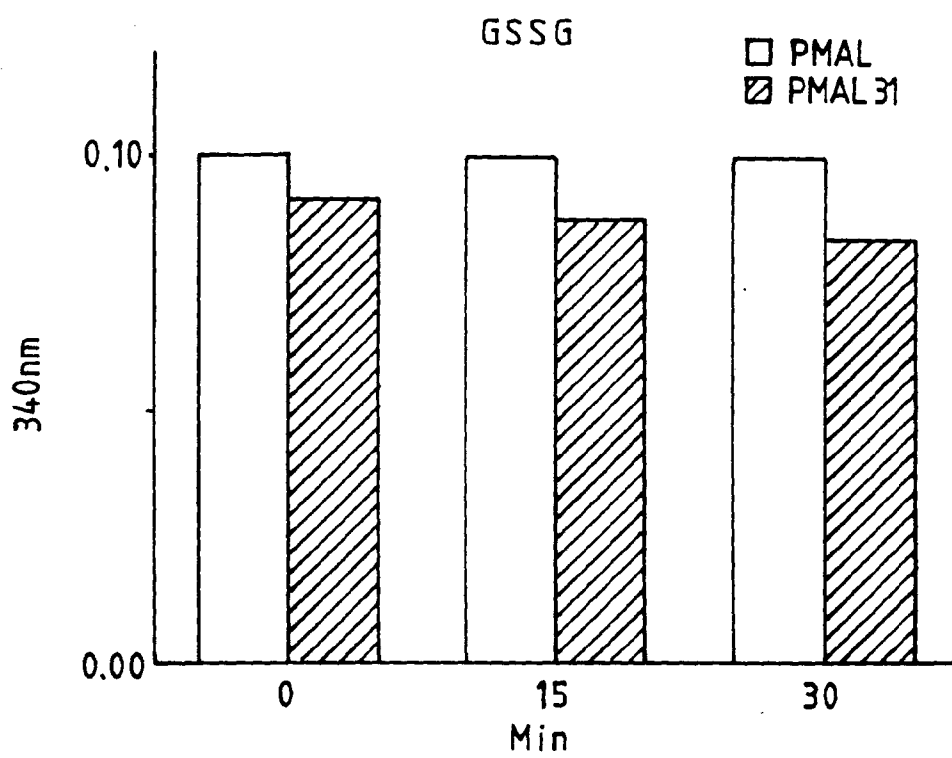


FIG.13