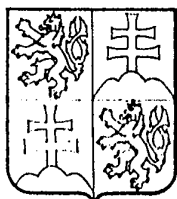


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATÍVNA
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

274 041

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 P 21/00
C 12 R 1/19

(21) PV 771 - 89.W

(22) Prihlásené 06 02 89

(40) Zverejnené 14 08 90

(45) Vydané 01 06 92

(75) Autor vynálezu

ZAJAC VLADIMÍR RNDr. CSc.,
SLÁVIKOVÁ KATARÍNA RNDr. CSc.,
ŠTEVURKOVÁ VIOLA, BRATISLAVA

(54)

Génovo zrekombinované bakteriálne bunky
Escherichia coli

(57)

Vynález sa týka génovo zrekombinovaných bakteriálnych buniek Escherichia coli exprimujúcich bielkovinu p60 anti-génnej špecificity obalového glykoproteínu vírusu leukémie hovädzieho dobytká. Bunky sú uložené v zbierke bakteriálnych buniek Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave pod označením ÚEO pEK17-5. Bielkovina p60 produkovaná týmito bunkami je vhodná na použitie v diagnostike zvierat infikovaných vírusom leukémie hovädzieho dobytká stanovením hladiny cirkulujúcich protilátok proti BLV antigénom metódami rádioimunotestu /RIA/ a imunoenzymatickom teste /ELISA/. Potenciálne je možné využiť bielkovinu p60 produkovanú bakteriálnymi bunkami pEK17-5 i k vakcinácii proti infekcii zvierat vírusom leukémie hovädzieho dobytká.

Vynález sa týka génovo zrekombinovaných bakteriálnych buniek *Escherichia coli* produkujúcich bielkovinu kódovanú expresným plazmidom s naklónovaným génom pre syntézu obalových glykoproteínov vírusu leukémie hovädzieho dobytku /BLV/.

Leukóza hovädzieho dobytku je infekčné ochorenie, horizontálne sa šíriace, ktorého pôvodcom je BLV. Vírusom indukované lymfoproliferatívne ochorenie je sprevádzané zmenami v krvi infikovaných zvierat, čo sa využívalo v diagnostike. Súčasné testy včasnej diagnostiky rádioimunologické /RIA/ a imunoenzymatické /ELISA/ sú nepriame a sú založené na prítomnosti protilátok proti BLV v sérach infikovaných zvierat /Devare, S.G., Chander, S., Samagh, B.S., Stephenson, J.R.: Evaluation of radioimmunoprecipitation for the detection of bovine leukemia virus infection in domestic cattle. J. Immunol. 119, /199/, 277; Altaner, C., Zajac, V., Bán, J.: A simple and inexpensive method for detection of BLV infected cattle based on a modified ELISA principle. Zbl. Vet. Med. B. 29, /1982/, 503. V týchto testoch antigénmi sú štrukturálne bielkoviny BLV. Producentom vírusu sú prevažne embryonálne ovčie obličkové bunky /FLK/ infikované BLV /Van Rer Maaten, M.J., Miller, J.M.: Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. Biblio. Haematol. 43, /1976/, 360. Vírus produkovaný bunkami FLK do rastového média sa z média koncentruje a purifikuje centrifugáciou pri vysokých obrátkach /centrifúgy firmy Beckman/. Produkcia vírusu FLK bunkami má určitý limit a dlhodobými kultiváciami sa znižuje. Kultivácia buniek produkujúcich BLV je veľmi náročná na vybavenie /termostaty, centrifúgy/, na sterilitu a na trvalé a drahé rastové médiá obohacované výživnými telaciami sérami. Bielkoviny telacieho séra z rastového média je veľmi ťažko oddeliť od vírusu, čo sťažuje diagnostické vyhodnocovanie vzhľadom na to, že ide o prítomné homológne bielkoviny, ktoré spôsobujú pseudopozitivitu.

Uvedené nedostatky odstraňujú génovo zrekombinované bakteriálne bunky *Escherichia coli* ÚEO pEK17-5 produkujúce bielkoviny p60 antigénnej špecificity obalového glykoproteína vírusu leukémie hovädzieho dobytku. Bunky sú uložené v zbierke bakteriálnych buniek Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislave, ul. Čs. armády 21, pod označením ÚEO pEK17-5.

Bunky ÚEO pEK17-5 boli získané transformáciou buniek *Escherichia coli* kmeň TK1046 /Weinstock, G.M., Rhys, C., Berman, M. L., Hamper, B., Jackson, D., Silhavy, T.J., Weisemann, J., Zweig, M.: Open reading frame expression vectors: A general method for antigen production in *Escherichia coli* using protein fusions to β -galactosidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, /1983/, 4432, expresným rekombinantným vektorom pORF1, v ktorom je naklónovaný gén pre syntézu obalových glykoproteínov BLV - gp51 a gp30. Takto pripravené bakteriálne bunky syntetizujú okrem svojich bielkovín aj novú neglykozylovanú bielkovinu o molekulovej hmotnosti 50 000 až 60 000 daltonov /ďalej p60/, ktorá je produktom vneseného génu. Imunologické vlastnosti novej bielkoviny boli testované imuno-elektroforetickou metódou /Western blotting/ so sérami z kráv infikovaných BLV. Bunkami ÚEO pEK17-5 produkujúca bielkovina p60 je imunologicky reaktívna so sérami z BLV infikovaných zvierat. So sérami neinfikovaných zvierat daná bielkovina nereaguje. Žiadna bielkovina o mol. hmotnosti 60 000 bakteriálnych buniek transformovaných expresným plazmidom bez génu, ktorý kóduje obalové glykoproteíny BLV, nereaguje so sérami z BLV infikovaných zvierat. Bunky ÚEO pEK17-5 možno množiť v štandardných médiách pre bakteriálne bunky - LB, M9 /Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982/. Bunky sa môžu uchovávať zmrazené pri -180°C až -20°C , resp. v agare. Rozmrazením sa získajú viabilné bunky, ktoré slúžia ako zdroj bielkoviny p60.

V odbornej literatúre týkajúcej sa leukémie hovädzieho dobytku neboli doteraz publikované práce o príprave antigénnych štruktúr cestou rekombinantných bakteriálnych buniek.

Príklad

Štandardným plazmidom pBY30905-20, ktorý obsahuje prakticky kompletný genóm BLV, restriktčným enzýmom BglII /Biorad/ sa získal 1224 bp DNA fragment, ktorý reprezentuje 84% génu BLV kódujúceho obalové glykoproteíny. Tento fragment sa inkubuje s nukleázou S_1 resp. Bal 31 a klónuje sa do vektora pORF1 otvoreného restriktčným enzýmom BamHI /Biorad/ a upraveného tiež nukleázou S_1 . Týmto rekombinantným plazmidom sa transformovali bunky *E. coli* kmeň MH3000. Rekombinantné plazmidy boli separované z modrých kolónií narastených na LB agar obsahujúci X-gal /5-brom-4-chlór-3-indolyl- β -D-galaktózid/ a z červených kolónií narastených na Mac Conkey agar. DNA rekombinantných plazmidov boli hybridizované s DNA fragmentom kódujúcim obalové glykoproteíny BLV značeným ^{32}P /Amersham/. Restriktčné enzýmy PvuII, PstI, SmaI /Boehringer/ boli použité na určenie orientácie inzertu.

DNA z plazmidov so správnou orientáciou inzertu bola transfekovaná do buniek *E. coli* kmeň TK1046 a u izolovaných klónov sa sledovala expresia bakteriálnych bielkovín zvýšením kultivačnej teploty z $30^{\circ}C$ na $37^{\circ}C$. Bakteriálne bunky boli ďalej rozrušené ultrazvukom a lyzované v pufrí 1.10^{-2} mol.l $^{-1}$ Tris pH 7.8, 2.10^{-3} mol.l $^{-1}$ fenylmetylsulfonylfluorid /PMSF/ a 2 mg lyozým a elektroforeticky delené v 10 % polyakrylamidovom géli /Leammi, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, /1970/, 680/. Rozdelené bielkoviny boli analyzované metódou Western blotting /Towbin, E., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, /1979/, 4350/ na nitrocelulóze /Amersham/. Testované hovädzie séra a monoklonálne protilátky proti rôznym epitopom gp51 boli riedené 1:200 v pufrí /5 % sušené mlieko bez tuku, 5.10^{-2} mol.l $^{-1}$ Tris pH 8.0, 0.10^{-2} mol.l $^{-1}$ NaCl, 2.10^{-3} mol.l $^{-1}$ CaCl $_2$, 0.2 % Triton X-100/. Po 24 hod. inkubácii pri $4^{\circ}C$ bola nitrocelulóza s naviazanými proteínmi premytá v TEN pufrí / 1.10^{-2} mol.l $^{-1}$ Tris pH 7.8, 1.10^{-1} mol.l $^{-1}$ NaCl, 1.10^{-3} mol.l $^{-1}$ EDTA /s 0,05 % Tween 20 a inkubovaná s ^{125}I -značeným proteínom A /Pharmacia/ 2 hod. Po vymytí nitrocelulózy v TEN pufrí s 0.05 % Tweenom 20 sa vysušila a viazaná rádioaktivita sa sledovala na filme /Kodak/. Vysvetlivky používaných triviálnych názvov: Tris = tris /hydroxymetylaminometan; NaCl = chlorid sodný; CaCl $_2$ = chlorid vápenatý; Triton X-100 = oktylfenolpolyetylénglykolester; EDTA = dvojsodná soľ kyseliny etyléndiaminotetraoctovej.

Množstvo bakteriálne produkovanej bielkoviny p60 je za optimálnych podmienok 1 až 4 % z celkových bakteriálnych bielkovín, čo je množstvo dostatočné na využitie tejto bielkoviny v diagnostike. Je vysoko citlivá a špecifická v reakcii s protilátkami proti glykoproteínu gp51.

Získané bakteriálne bunky ÚEO pEK17-5 majú priemyselné využitie pri veľmi nízkych výrobných nákladoch /kultivácia vo fermentoroch/ ako zdroj bielkoviny p60, ktorá sa môže použiť v diagnostike zvierat infikovaných BLV. V rádioimunoteste /RIA/ alebo imunoenzymatickom teste /ELISA/ môže nahradiť vírusové bielkoviny a slúžiť pre kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie cirkulujúcich protilátok proti vírusu. Potenciálne je možné využitie týchto buniek resp. izolovanej bielkoviny p60 k vakcinácii zvierat.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Génovo zrekombinované bakteriálne bunky *Escherichia coli* ÚEO pEK17-5 produkujúcu bielkovinu p60 antigénnej špecificity obalového glykoproteínu vírusu leukémie hovädzích dobytká.