

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)

197349

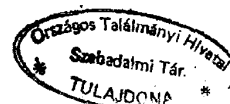
Bejelentés napja: (22) 1983.05.23. (21) (1810/83)

Elsőbbsége: (32) 1982.05.25.
(31) (381 992) (382 051)
(33) US

Közzététel napja: (41) (42) 1984.05.28.

Megjelent: (45) 1990.01.10.

Nemzetközi
osztályozás:
(51) NSZO
C 12 N 15/00



Feltalálók: (72)

Mayne Nancy Gail, Belegaje Ramamoorthy,
ifj. Burnett James Paul, Hsiung Hansen
Maxwell, Indianapolis, Indiana, US

Szabadalmas: (73)

Eli Lilly and Company,
Indianapolis, Indiana, US

(54) ELJÁRÁS NÖVEKEDÉSI HORMONOK KIFEJEZÉSÉRE HASZNÁLHATÓ KLÓNOZÓ VEKTOROK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

1

2

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás humán vagy bovin növekedési hormon kifejezésére használható rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor előállítására. Az eljárás során összekapcsolunk

a) funkcionális replikációs origót tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst;
b) egy vagy több dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst, amelyek mindegyike megfelelő gazdasejtbe transzformálva az adott vektort, a transzformálható gazdasejtnak szelekcióra alkalmas tulajdonságot biztosít; és
c) egy olyan dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst, amely tandem elhelyezkedésben az alábbi szekvenciákat hordozza:

1) egy E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia promotere,
2) egy E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 5'-nem transzlatált régiója, és
3) egy transzlációs start kodon, amelyet egy

A) humán vagy bovin növekedési hormont meghatározó szekvencia, vagy
B) egy enterokináz hasítási helyet meghatározó nukleotid-szekvencia, amelyhez közbenső kodonok nélkül egy humán vagy bovin növekedési hormont meghatározó nukleotid-szekvencia

kapcsolódik, követ, és kívánt esetben
d) egy E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 3'-nem transzlatált szakaszának egészét vagy egy részét, ahol a nem-transzlatált szakasz jobbra haladva humán vagy bovin növekedési hormont leíró szekvenciához kapcsolódik, és kívánt esetben
e) egy E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia transzkripció terminációs régiójának egészét vagy egy részét, ahol a transzkripció terminációs régió jobbra haladva kapcsolódik az idegen proteint kódoló szekvenciához, és kívánt esetben
f) egy E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia transzkripció terminációs régiójának egészét vagy részét, ahol a transzkripció terminációs szakasz jobbra haladva kapcsolódik az adott 3'-nem transzlatált régióhoz.

197349

A találmány protein termékek előállítására használható új dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciák és klónozó vektorok (hordozók) előállítására vonatkozik.

Inouye Masayori és munkatársai kiterjedt vizsgálatokat végeztek a Gram-negatív baktériumok külső membrán proteinjeit, elsősorban a lipoproteint meghatározó gének megismerésére. A vizsgálatok bizonyították, hogy a lipoproteinek viszonylag nagy mennyiségben vannak jelen a baktérium sejtekben. Így például az *Escherichia coli* külső membránjában sejtenként $7,2 \times 10^5$ lipoprotein molekula van. Ezen felül, mivel úgy tűnik, hogy az *E. coli* kromoszómában csak egyetlen lipoprotein strukturgén létezik, transzkripciójának módja igen hatékony kell legyen.

Inouye és munkatársainak a közelmúltban végzett kísérletei arra irányultak, hogy a lipoproteint olyan megfelelően elkészített plazmiddal fejezzék ki, amelyet megfelelően transzformált mikroorganizmusokba juttattak, és amely kísérletek lehetővé teszik a különböző lipoprotein gének (lpp) meghatározását és dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciáinak analízisét. Nakamura és Inouye közlik [Cell, 18, 1109-1117 (1979)] az *E. coli* külső membrán lipoproteinjének dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciáját. Ezen szekvencia promotor szakaszának analízise bizonyos érdekességeket mutatott. Először is úgy találták, hogy a transzkripció iniciációs helyet (-1-től a -261. bázispárig) megelőző 261 bázispár adenin-timin-tartalma 70%, azaz igen magas a 322 bázispárból álló mRNS szakasz 53%-os a transzkripció terminációs hely után következő 127 bázispárból álló szegmens 44%-os, és az *E. coli* kromoszóma átlagos, 49%-os adenin-timin-tartalmához képest. Másodszor, úgy találták, hogy a transzkripció iniciációs helytől balra eső első 45 bázispár (-1-től a -45. bázispárig) 36 olyan bázist tartalmaz, amely vagy adenin vagy timin (80%). Harmadszor, a transzkripció iniciációs helytől 8 bázissal eltolódva egy a Pribnow-boxszal azonos heptanukleotid-szekvencia helyezkedik el; negyedszer, a -27. és a -39. bázispárok között mindkét szálon egy RNS polimeráz felismerő hellyel analóg szekvencia található. Ötödször, a transzkripció iniciációs helynél egy hosszú szimmetrikus szakasz található.

Inouye és munkatársai kijelentették, hogy ezek a tulajdonságok külön-külön vagy egymással kombinálódva felelősek az lpp promotor nagyfokú hatékonyságáért. Részletebben szólva, úgy találták, hogy a promotor-szekvencia magas adenin-timin-tartalma destabilizálja a dezoxi-ribonukleinsav hélix-szerkezetét, és ezzel a transzkripció kezdetéhez létfontosságú szálkicsavarodást elősegíti.

Inouye csoportja továbbá kimutatta, hogy nagyfokú homológia áll fenn a lipoprotein génsek szekvenciák között, valószínűleg az összes Gram-negatív festődésű baktérium

esetén. Így a *Serratia marcescens* lipoprotein gén dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciájának összehasonlítása az *E. coli* lpp génjével nagyfokú homológiát mutatott [Nakamura és

5 Inouye, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 1369-1373 (1980)]. Kimutatták, hogy különösen nagyfokú az azonosság a promotor régióban (84%-os homológia), ennek extrém magas adenin- és timin-tartalma (78%) összehasonlítható az *E. coli*-éval (80%). Ugyanakkor, a lipoprotein mRNS 5'-nem-transzlatált szakasza is nagy homológiát (95%) mutat.

Újabban Yamagata és munkatársai [J. Biol. Chem., 256, 2194-2198 (1981)] analizálták az *Erwinia amylovora* lipoprotein génjeinek dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciáját, és összehasonlították az *E. coli* és *E. marcescens* génjével. Ezek a vizsgálatok szintén alátámasztják az lpp gének között fennálló nagyfokú homológiát. A promotor régió (-45-től a -1-ig) igen hasonló, 87% a homológia az *E. coli*-hoz és 93% az *S. marcescens*-hez viszonyítva. Igen magas adenin- és timin-tartalmat mutattak ki (80%), ez gyakorlatilag azonos az *E. coli*-éhoz (80%) és az *S. marcescens*-éhez (78%). Az mRNS nem-transzlatált szakaszának szekvenciája 97%-os homológiát mutat az *E. coli*-éval és 92%-os homológiát az *S. marcescens*-ével összehasonlítva.

Az Inouye által bizonyított tény, hogy a lipoprotein gén nagyfokú konstitutív transzkripciót szenved, azt jelzi, hogy ez alkalmas idegen dezoxi-ribonukleinsav-fragmensek kifejezésére. Inouye és munkatársainak munkája továbbá azt látszik bizonyítani, hogy a Gram-negatív festődésű baktériumok, például az *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia amylovora*, *Serratia marcescens* lipoprotein génjei is felhasználhatók.

Inouye és munkatársainak kísérletei nemrég bizonyították, hogy a lipoprotein gén alkalmas termék kifejezésére [Lee, Nakamura és Inouye, J. Bacter., 146, 861-866 (1981)]. E munka során az *S. marcescens* lipoprotein génjét lambda fág-vektorba klónozták, és ezután reklónozták a pBR322 és pSC101 plazmid vektorokba. Az *S. marcescens* lpp gént hordozó mindkét vektorral *E. coli* sejteket transzformáltak. A kísérleti tények szerint normális kifejeződés történt, bár az *E. coli* lpp gént hordozó vektorokhoz képest valamivel kisebb mértékben.

Akárhogy is, az irodalomban közlik, hogy az lpp gén promotert és 5'-nem-transzlatált régiókat tartalmazó vektorok felhasználhatók jelentős mértékű lipoprotein-kifejezésére.

A leírás során vektor alatt plazmidot, fág dezoxi-ribonukleinsavat vagy más, olyan dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát értünk, amely

1) egy gazdasejtben replikálódni képes;

- 2) egy gazdasejtet transzformálni képes; és
- 3) a transzformált sejtek azonosítására használható markert hordoz.

A találmány szerinti eljárás klónozó vektorok specifikus osztályának két változatára vonatkozik. Külső proteinek jelentősen megnövekedett kifejeződése érhető el a klónozó vektorok bármelyik kiviteli változatával. Az első kiviteli változat szerint a klónozó vektorokat úgy készítjük el, hogy tandem elhelyezkedésben tartalmazzanak egy, a lipoprotein promotor régiót meghatározó nukleotid-szekvenciát, a lipoprotein 5'-nem-transzlatált szakaszát meghatározó nukleotid szekvenciát, és egy olyan szekvenciát, amely egy külső eredetű protein terméket határoz meg. Az ilyen terméket meghatározó szekvenciát egy transzlációs startjelet reprezentáló kodonon át kötjük a lipoprotein gén 5'-nem-transzlatált szakaszának 3'-végéhez. A második kivitelezési változat szerint az idegen eredetű protein terméket meghatározó szekvenciát az előzőekben megadott start kodonon és egy enterokináz hasítási helyet meghatározó nukleotid-szekvencián át kapcsoljuk a lipoprotein gén 5'-nem-transzlatált szakaszának 3'-végéhez.

A találmány tárgya eljárás humán vagy bovin növekedési hormon kifejezésére használható rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorok előállítására. Az alábbiakat tartalmazó klónozó vektort állítjuk elő:

- a) E. coliban funkcionális replikációs origót tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav-szegmens;
- b) egy vagy több dezoxi-ribonukleinsav-szegmens, mindegyik egy olyan tulajdonságot juttat transzformálható E. coli sejtbe transzformációkor, amely szelekcióra használható; és
- c) tandem elhelyezkedő, alábbiakat tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav-szegmens:
 - 1) egy lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia promotere,
 - 2) egy lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 5'-nem-transzlatált szakasza, és
 - 3) egy transzlációs start kodon, és ezután egy külső proteint meghatározó szekvencia, a kettő között a sejt saját proteinjét meghatározó nukleotid-szekvencia sem egy része, sem egésze nem lehet, vagy a transzlációs start kodon után egy enterokináz hasítási helyet meghatározó nukleotid-szekvencia helyezkedik el, ehhez megszakítás nélkül egy külső eredetű proteint leíró nukleotid-szekvencia kapcsolódik.

A dezoxi-ribonukleinsav klónozó rekombináns vektor előállítására az a), b) és c) pont dezoxi-ribonukleinsav-szegmenseket összekapcsoljuk. Ahogy azt már közöltük, a találmány célja olyan dezoxi-ribonukleinsav-

-szekvenciák és rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorok előállítása, amelyek igen nagy hatékonysággal termelik a külső eredetű proteint. Mindegyikükben szerepel legalább egy lipoprotein gén (lpp) rendszer, és E. coliból származó lipoprotein gén. Külső eredetű protein alatt olyan protein terméket értünk, amely a lipoprotein gén-rendszer által kifejezett lipoprotein molekulától, vagy bármilyen ehhez hasonló molekularészről különbözik.

Az lpp gént öt elemmel írhatjuk le. Abban a sorrendben, ahogy a génben szerepelnek, ezek a következők:

- 1) a promotor régió;
- 2) az 5'-nem-transzlatált szakasz;
- 3) a lipoproteint kódoló szekvencia;
- 4) a 3'-nem-transzlatált szakasz; és
- 5) transzkripció terminációs hely.

Ezen elemek funkciója a gén-rendszerben jól ismert. A promotor régió szabályozza az mRNS-termelés kezdetét (transzkripció). A promotor mentes lehet külső szabályozástól (konstitutív), állhat egy represszor szabályozása alatt, amely utóbbi - ha jelen van - leállítja a gén funkcióját. Állhat továbbá egy inducer szabályozása alatt; ez az inducer olyan anyag, amely a génfunkciót megindítja. Az lpp gén nem áll külső szabályozás alatt, ezért konstitutív.

A promotor közelében, vagy a promotorban helyezkedik el a transzkripció iniciációs hely, ez az a pont, ahová a ribonukleinsav polimeráz kötődik, és ahol elkezdődik az mRNS-transzkripciója. Ha egyszer a transzkripció megindult, mRNS keletkezik. Az mRNS szerkezetét a génelemek közül a második-negyedik határozza meg.

A keletkező mRNS protein termékké fordítható szekvenciát hordoz. A transzlatálható szekvencia az 5'-nem-transzlatált szakasztól jobbra, a 3'-nem-transzlatált régiótól pedig balra helyezkedik el. A transzlációt a riboszómáknak az mRNS molekulán lévő 5'-nem-transzlatált szakaszon lévő szekvenciához való kötődése szabályozza, ez a riboszóma kötőhely és egy transzlációs start kodonnal (AUG) kezdődik, amely egyébként kódolja a metionin (Met) aminosavat is. A transzláció a transzlatált szakasz végén elhelyezkedő egy vagy több terminációs kodonnal áll le.

A rekombináns dezoxi-ribonukleinsav technikákkal lehetséges olyan klónozó vektorok előállítása, amelyek felhasználhatók külső eredetű (idegen) proteinek előállítására oly módon, hogy a vektorokba kifejezést szabályozó szekvenciákat építünk be, azaz olyan nukleotid-szekvenciát, amely szabályozza az adott struktúrához kapcsolódva annak kifejeződését. A találmány szerinti eljárás során előállított klónozó vektorok az lpp kifejeződést szabályozó szekvenciát vagy annak egy részét tartalmazzák, azaz hordozzák az előzőekben ismertetett 1), 2), 4) és 5) elemeket. A négy elem közül a találmány szerinti klónozó vektorban csak az 1. és 2. elemek

szerepelnek minden esetben, azaz a promotor régió és az 5'-nem-transzlatált szakasz.

A rekombináns dezoxi-ribonukleinsav technikák használatakor általános, hogy egy külső eredetű protein előállítására a proteint meghatározó dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát egy klónozó vektor kifejezést szabályozó szekvenciájába építjük be egy olyan ponton, hogy a termék hibrid proteinből álljon. Hibrid protein alatt olyan rekombináns dezoxi-ribonukleinsav által meghatározott terméket értünk, amely áll egy természetes (endogén), a kifejeződést szabályozó szekvencia által meghatározott protein egészéből vagy annak egy részéből (esetünkben a lipoprotein), amelyhez kapcsolódik az idegen (exogén) protein.

A megfelelően tervezett hibrid protein az endogén proteinrészt és az idegen proteint elválasztó szakaszon hasítási helyet tartalmaz. A hasítási hely révén érett exogén protein termékhez jutunk a hibrid protein kémiai vagy enzimatisz kezelésével.

Ahogy azt az előzőekben már megadtuk, külső eredetű proteinek kifejezésére felhasználható az lpp kifejeződését szabályozó szekvencia. A közelmúltban azonban felfedezték, hogy az lpp kifejeződését szabályozó szekvencia igen előnyösen használható fel exogén proteinek kifejezésére abban az esetben, ha a molekulát úgy állítjuk össze, hogy a dezoxi-ribonukleinsav-szegmens tandem elhelyezkedésében hordozza a lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia promoterét és 5'-nem-transzlatált szakaszát, és egy transzlációs start kodont, amintán, anélkül, hogy endogén proteint meghatározó nukleotid-szekvencia vagy szekvencia-rész következne, exogén proteint meghatározó szekvencia vagy egy enterokináz hasítási helyet kódoló nukleotid-szekvencia következik, amelyhez megszakítás nélkül kapcsolódik az exogén proteint leíró szekvencia. Ez nem azonos a lipoprotein vagy ennek egy részét és exogén proteint tartalmazó hibrid proteinnel.

A találmány szerinti klónozó hordozók előállításához több elemre van szükség. Kettő a szükséges elemek közül a klónozó vektorok előállításakor általánosan használt. Először is, a vektornak tartalmaznia kell egy funkcionális replikációs origót tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst, ez a replikon. A plazmidok és fág dezoxi-ribonukleinsavak természetükből következően tartalmaznak gazdaszövetben replikációt biztosító replikonokat.

Másodsor, a vektornak rendelkeznie kell egy olyan dezoxi-ribonukleinsav-szegmessel, amely transzformálható gazdaszövetbe egy olyan tulajdonságot juttat, amely lehetővé teszi a nem-transzformált sejtek szelektációját a transzformált sejtek közül. Több tulajdonságot használhatunk szelekciós célokra. Az egyik leggyakrabban használt tulajdonság az antibiotikum rezisztencia, például a tetraciklinnel vagy ampicilinnel szembeni rezisz-

tencia. Az előzőekben ismertetett két elem általában jelen van, és felismerhető a klónozó vektorokban. Ilyen vektorok például a bakterium plazmidok, mint például az *E. coli* plazmidjai, köztük a pBR322, pMB89, ColE1, pCR1; szélesebb gazda-specifititású plazmidok, például az RP4; fág dezoxi-ribonukleinsavak, mint például a lambda és mások. A legtöbb, de talán az összes fentiekben tett vektor eleve tartalmazza a megadott két elemet.

A találmány szerinti specifikus vektorok harmadik eleme a lipoprotein kifejeződését szabályozó szekvencia. Az *E. coli* lipoproteint kifejező szabályozó szekvencia jelen van a pKEN111 plazmidban, és *E. coli* CC620 sejtekben szaporítható. A tenyészetet az alábbi állandó törzsgyűjteményben helyeztük letétbe: Northern Regional Research Center, Agricultural Research, North Central Region, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604. Innen az NRRL 15 011 sorszámon rendelhető meg. A lipoprotein kifejeződését szabályozó szekvencia kihasítható a pKEN111-ből az ismert restrikciós helyeket és az ezeknek megfelelő restrikciós endonukleázokat felhasználva. Több más lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia is rendelkezésünkre áll, ezeket ismert módszerekkel használjuk. Ezek a módszerek tartalmazzák például a szintézissel való előállítást vagy megfelelő lpp-szekvenciákat felhasználva egy próbával való izolálást (például pKEN111), és az lpp-szekvenciák között fennálló nagyfokú homológiát felhasználva, ezekkel a próbákkal hibridizációval szelektáljuk a más forrásokból származó lpp-szekvenciát.

Rutin módszereket használva állítjuk elő az előnyös klónozó vektorokat a lipoproteint kifejeződést szabályozó szekvencia beépítésével. A klónozó vektorokban különböző helyek léteznek, amelyekbe erre a helyre specifikus restrikciós endonukleáz használva belehasítunk. Bármely ilyen helyet kiválaszthatunk a lipoproteint kifejező szabályozó szekvencia beépítésére. Például a jól ismert és jól dokumentált pBR322 plazmidon több megfelelő restrikciós hely létezik, ezek bármelyikét felhasználhatjuk beépítési helyként. A β -laktamáz génen belül egy PstI hely létezik. A specifikus kódoló szakaszokon kívül eső más helyek az EcoRI és PvuII. Ezeket és más helyeket a témában jártas szakemberek felismerik.

Ezen helyeket vagy másokat felhasználva a lipoprotein kifejeződést meghatározó szekvenciát vagy ennek alapvető fontosságú részét könnyen beépíthetjük a jelen leírásban megadott vektorok előállítása érdekében.

A negyedik elem, amely a találmány szerinti vektorokra továbbá jellemző, egy külső eredetű proteint kódoló dezoxi-ribonukleinsav-szekvencia. A találmány szerinti vektorokban lévő külső eredetű proteint meghatározó dezoxi-ribonukleinsav-szekvencia legl-

nyegesebb tulajdonsága annak elhelyezkedése. Ennek a lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 3'-végétől és az 5'-nem-transzlatált szakasztól jobbra kell esnie, és kapcsolatban kell lennie ezzel egy transzlációs start kodonon keresztül. A találmány szerinti vektorokban a lipoproteint meghatározó dezoxi-ribonukleinsav-szekvencia egy részének sem szabad az 5'-nem-transzlatált szakasz és a külső eredetű proteint meghatározó szekvencia közé esnie.

A találmány szerinti vektorok második kivitelezési változatára jellemzően, egy ötödik elem kapcsolódik, így módon a transzlációs kodont egy enterokináz hasítási helyet meghatározó nukleotid-szekvencia követi, amelyhez, közbeeső rész nélkül, a külső eredetű proteint leíró szekvencia kapcsolódik. Az előzőekben megadott hasítási hely aminosav-szekvenciáját felismeri és karboxil-terminális végén hasítja az enterokináz enzim. Az enterokinázzal hasítható aminosav-szekvenciát meghatározó nukleotid-szekvencia 5'-végén hozzákapcsolódik a transzlációs start kodonhoz, és 3'-végén pedig egy olyan nukleotid-szekvencia 5'-véghez, amely a külső eredetű proteint határozza meg, így módon a kapott transzlációs termék (metionin) - (enterokináz hasítási hely) - (külső eredetű protein); ez enterokinázzal kezelve érett külső eredetű proteinné hasad.

Az enterokináz (3. 4. 21. 9) „egyik, a duodenum membránhoz kapcsolt számtalan hidroláz egyikének” [Liepnieks Light, J. Biol. Chem. 254, 1677-1683 (1971)] izolálását és tisztítását több közleményben ismertetik, például Liepnieks (lásd előbb) Maroux és munkatársai [J. Biol. Chem., 246, 5031-5039 (1971)] és Baratti és munkatársai [Biochimica et Biophysica Acta, 315, 147-161 (1973)] közleményei.

Az enterokináz a peptidet egy lizin (Lys) karboxilcsoportjánál hasítja, amelyet több aminosav előz meg, azaz glutaminsav (glu) és/vagy aszparaginsav (asp). Így Light és munkatársai [Anal. Biochem., 106, 199-206 (1980)] több olyan aminosav-szekvenciát közölnek, amelyeket az enterokináz felismer. Ilyenek például az alábbiak:

Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Lys,
Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys,
Phe-Pro-Ile-Glu-Asp-Lys,
Leu-Pro-Leu-Glu-Asp-Asp-Lys,
Ala-Asp-Asp-Lys,
Asp-Asp-Asp-Asp-Lys,

és mások.

A találmány szerinti klónozó vektorokban bármely fenti és más szekvenciákat meghatározó nukleotid-szekvencia jelen lehet. Az egyetlen igény az, hogy olyan legyen ez a nukleotid-szekvencia, hogy az általa kódolt aminosav-szekvencia felismerhető legyen, vagy, ha egy hosszabb láncú peptidben van jelen, hasítható legyen karboxil-terminális végén enterokinázzal.

6

A fenti igényeket kielégítő vektorok előállítása során az E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 5'-nem-transzlatált régiójában jelenlévő egyetlen XbaI helyet használjuk ki. Az XbaI hely hasításakor az 5'-nem-transzlatált szakasz egy része kihalad. Oligonukleotid-szintézissel előállíthatunk egy olyan linkert, amely tartalmazza az 5'-nem-transzlatált régió eltávolított részét, amelyhez egy start kodont meghatározó dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát kötünk, vagy a start kodont követően az enterokinázzal hasítható helyet és a külső eredetű protein egy részét vagy egészét meghatározó szekvenciát.

A külső eredetű proteint meghatározó dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát előállíthatjuk szintetikusán, azaz az ismert foszfo-triészter-módszert vagy más, jól ismert technikát használva, de előállíthatjuk ezt a dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát ismert módon izolált mRNS másolatként is. Az előállított cDNS másolat szükség esetén a start kodonhoz közeleső ponton lévő restrikciós helyen hasíthatjuk. A találmány szerinti klónozó vektorok előállításának egyik kiviteli változata szerint előállítunk egy olyan linkert, amely áll az XbaI hasítási reakció során eltávolított lipoprotein 5'-nem-transzlatált szakasz egy részéből, ezután következik a start kodont is magába foglaló, külső eredetű protein hasított része.

Az előállítást szintetikus módszerrel végezzük. A találmány szerinti klónozó vektorok előállításának egy második kivitelezési változata szerint szintetikusán előállítjuk azt a linkert, amely tartalmazza az XbaI enzimmel kihalított lipoprotein 5'-nem-transzlatált fragmenst, és ezután elhelyezkedve pedig a start kodont, az enterokináz hasítási helyet és a külső eredetű protein hasított részét. Ezeket a hiányzó részeket pótolni képes linkereket a lipoprotein kifejeződését szabályozó szekvencia többi rendelkezésre álló elemével összekapcsoljuk, amiután vektort kapunk.

A találmány szerinti eljárással előállított klónozó vektorokat felhasználhatjuk több külső eredetű protein előállítására, többek között emlős és humán hormonok, enzimek és immunogén proteinek (vagy ezek intermedierjeinek) előállítására. Ilyen termék például az inzulin A lánc, az inzulin B lánc, a proinzulin, az interferon, a növekedési hormon, a száj és körömfájás antigén proteinjei, a szomatostatín, a β -endorfin és mások. Előnyök azok a klónozó vektorok, amelyek a humán növekedési hormont vagy a marha növekedési hormont termelik. A találmány szerinti eljárás első kivitelezési változata szerint előállított klónozó vektorok természetesen amino-terminális végükön metionint tartalmaznak a start kodon jelenléte miatt. A második kivitelezési változat szerint előállított vektorok kifejeződő termékei metionint (start kodon), enterokináz hasítási helyet és

külső eredetű proteint határoznak meg. Érett külső eredetű protein előállítására az utóbbi kifejeződő terméket ismert módon (lásd például Light és munkatársai, mint előbb) enterokinázzal kezeljük.

A találmány szerinti klónozó vektorokat több gazdasejtben használhatjuk, például Gram-negatív festődésű prokariota mikroorganizmusokban, például *Escherichia coli*, *Serratia*, *Pseudomonas* sejtekben és hasonlóknak; Gram-pozitív festődésű prokariota organizmusokban, mint például *Bacillus* vagy *Streptomyces* sejtekben és másokban; használhatjuk ezeket eukariota organizmusokban is például *Saccharomyces* sejtekben is. Előnyösen azonban gazdasejtként Gram-negatív prokariota organizmust használunk. Különösen előnyös az *E. coli*, például az *E. coli* K-12 törzse, mint például az RV308.

Jól ismert módszereket használunk a megfelelő gazdasejt találmány szerinti vektorokkal való transzformálásra, a sejtekben sokszorosítjuk a vektorokat, és standard fermentációs körülmények között fejesszük ki a külső eredetű protein terméket. A protein terméket a kapott tenyészetből ismert módszerekkel izoláljuk.

A találmány szerinti klónozó vektorok szerkezetét és funkcióját az alábbi példákban szemléltetjük. A példákat a mellékelt ábrák alapján kell elolvasnunk és megértenünk. Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1-4. ábrákon a találmány szerinti klónozó vektorok mindkét előállítási változata során használt intermedierok és kiindulási anyagok preparálását ismertetjük.

Az 1-4. ábrákkal összefüggő 5. ábrán sematikusan szemléltetjük az 1. példában ismertetett módszert, amellyel a metionil-humán növekedési hormon termelésére használható klónozó vektort állítjuk elő.

Az 1-5. ábrákkal összefüggő 6-8. ábrákon együttesen szemléltetjük a 2. példában ismertetett módszert a metionil-marha növekedési hormon előállítására használható klónozó vektor izolálására.

A 9. ábrán, amely összefügg az 1-5. ábrákkal, sematikusan ábrázoljuk a 3. példában megadott módszert, amellyel az 1. példa szerinti klónozó vektor egy variánsát állítjuk elő, és amelyet a metionil-humán növekedési hormon termelésére használhatunk. Az 1-4. ábrákkal összefüggő 10. ábrán sematikusan ábrázoljuk a 4. példában ismertetett módszert a találmány szerinti klónozó vektorok második típusainak előállítására, ezeket a vektorokat a humán növekedési hormon előállítására használjuk fel.

Az 1-4. és 10. ábrákkal összefüggő 11-13. ábrákon sematikusan ábrázoljuk az 5. példában megadott módszert, amivel a második kivitelezési változat szerinti, és a marha növekedési hormon előállítására használható klónozó hordozót állítjuk elő.

A találmány szerinti plazmidok első és második típusainak előállításakor használt köztes termékek és kiindulási anyagok készítését az alábbiakban ismertetjük.

5. Kiindulási anyagként pKEN021 plazmid vektor (lásd a 3. ábrán a 106. sorszámot) XbaI (5'-TCTAGA-3') és BamHI (5'-GGATCC-3') restrikciós endonukleázokkal való hasításakor kapott 5,1 kb nagyságú fragmenst használjuk. A pKEN021 az első ábra 101. helyén bemutatott pKEN111 származéka [Lee és munkatársai, *J. Bact.*, 146, 861-866 (1981); és Zwiebel és munkatársai, *J. Bact.*, 145, 654-656 (1981)]. A plazmid az *E. coli* CC620 törzsben van (NRRL 15 011). A pKEN111 plazmidnak egy 2,8 kb nagyságú fragmensén rajta van az *E. coli* lipoprotein génje. A fragmens leírását Nakamura és Inouye adja meg [Cell, 18, 1109-1117 (1979)]. A pKEN021 plazmidban az egyetlen EcoRI (5'-GAATTC-3') és a SalI (5'-GTCGAC-3') pBR322 restrikciós hely közötti 650 bázispárból álló szekvenciát kicseréltük az *E. coli* lipoprotein génből izolált szekvenciával. Az összes, ebből a génből származó funkcionális rész nukleotid-szekvenciáját meghatározták. A lipoprotein génszekvencia [Nakamura és Inouye, Cell, 18, 1109-1117 (1979)] egy 462 bázispárból álló AluI (5'-TCTAGA-3') fragmenst hordoz a lipoprotein gén első kodonjától (metionin) balra esve. Ez a fragmens tartalmazza a promotert, az 5'-nem-transzlatált szakaszt és a riboszóma kötőhelyet. A riboszóma kötőhelyen belül 16 bázispárral a transzlációs iniciációs metionin kodonja előtt egyetlen XbaI (5'-TCTAGA-3') restrikciós hely létezik. A strukturgén transzlációs terminációs kodonjától balra eső (105 bázispárral) PvuII (5'-CCAGCTG-3') restrikciós helyet kicseréltük egy BamHI (5'-GGATCC-3') restrikciós helyre, úgy, hogy egy szintetikus DNS adapter fragmenst kapcsoltunk. (5'-CCGATCCGG-3'; a Collaborative Research terméke). A BamHI helyett a lipoprotein utolsó 35 aminosavát meghatározó kódoló szekvencia, a transzlációs terminációs kodon és az mRNS 3'-nem-transzlatált szakaszának megfelelő szekvencia követi. A pKEN021 plazmid tartalmaz továbbá egy 85 bázispárból álló, különleges szekvenciát, amely nincs kapcsolatban a lipoprotein génnel, és amely az *E. coli* kromoszómában ettől jobbra helyezkedik el. Ez a szekvencia azért létezik, mert a gén eredeti izolálása során használt módszerek és restrikciós enzimek által felismerhető helyek természetéből következik.

Az 1., 2. és 3. ábra kapcsán megadjuk az alábbiakban azt a módszert, amellyel a pKEN111 plazmidból előállítjuk a pKEN021 plazmidot. Úgy járunk el, hogy 50 µg pKEN111 (1. ábra 101.) plazmidot 25 egység HpaII (5'-CCGG-3') restrikciós enzimmel kezelünk, 300 µl alábbi összetételű pufferban:

20 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4
10 mmól magnézium-klorid,

6 mmól β -merkaptó-etanol, literenként.

A reakciót 2 órán át végezzük 37 °C hőmérsékleten. Kétszer 300 μ l alábbi eleggyel extraháljuk a reakcióelegyet: fenol és kloroform 50:50 arányú elegye. A vizes fázist 2,5 térfogat etanollal kicsapjuk. A dezoxi-ribonukleinsav csapadékot 100 μ l elektroforézis-pufferban oldjuk, és 5% poliakril-amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk. A gél 0,5 μ g/ml etidium-bromid-oldattal festjük, és a csíkokat a távolabbi tartományba eső hullámhosszúságú ultraibolya fényben figyeljük meg. Elektroelúcióval egy dialízis zsákba izoláljuk a 950 bázispárból álló csíkot. A terméket fenol és kloroform elegyével extraháljuk és etanollal kicsapjuk, majd a 2,5 μ g-nyi mennyiségű dezoxi-ribonukleinsavat 25 μ l TEN-elegyben oldjuk. Ennek összetétele a következő:

10 mmól nátrium-klorid,
10 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
és

1 mmól nátrium-etilén-dinitril-tetraecetsav, pH = 8,0, literenként.
2 μ g, 950 bázispárból álló HpaII fragmenst AluI (5'-AGCT-3') restrikciós enzimmel kezelünk 200 μ l alábbi összetételű pufferban:

50 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,6,
és
6 mmól magnézium-klorid, és
6 mmól β -merkaptó-etanol, literenként.

A reakciót 37 °C hőmérsékleten végezzük, 2 órán át. A dezoxi-ribonukleinsavat 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk, és a keletkezett 462 bázispárból álló AluI fragmenst az előzőekben megadottak szerint eljárva izoláljuk és tisztítjuk. A 462 bázispárból álló AluI fragmens 1 μ g-ját 10 μ l T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz pufferben oldjuk. Ennek összetétele a következő:

66 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,6
10 mmól magnézium-klorid,
10 mmól ditio-treitol,
0,4 mmól adenzin-trifoszfát, literenként.

Az elegyhez előzőleg 150 pikomól foszforilezett EcoRI linkert adunk (5'-GGAATTC-3', a Collaborative Research terméke), majd 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázzal egészítjük ki. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet, majd 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk, és ezután 100 μ l-re hígítjuk EcoRI puffer adagolásával. Ennek összetétele a következő:

100 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,2,
50 mmól nátrium-klorid,
10 mmól magnézium-klorid,
6 mmól β -merkaptó-etanol, literenként.

Az elegyhez 40 egység EcoRI enzimet adunk. 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubálunk, majd az elegyet fenol és kloroform

elegyével extraháljuk és etanollal kicsapjuk, az előzőekben megadottak szerint eljárva. A dezoxi-ribonukleinsavat 20 μ l, 0,1 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz-pufferban oldjuk, ehhez előzőleg 0,1 μ g pBR322 dezoxi-ribonukleinsavat (lásd 1. ábra 102.) adunk, amelyet EcoRI enzimmel linearizáltunk, és a molekula végein lévő foszfátcsoportok eltávolítására alkalikus foszfátazzal kezeltünk. A ligációs reakciót 16 órán át 4 °C hőmérsékleten végezzük, majd az eleggyel megfelelő E. coli törzset (hsr⁻, hsm⁺) transzformálunk, például HB101 sejteket. A baktérium sejteket kompetenssé tesszük a transzformálásra, az ismert kalcium-kloridos kezeléssel. A transzformánsokat 12 μ g/ml tetraciklint tartalmazó agar-lemezekben szelektáljuk. Több tetraciklinre rezisztens telepből izoláljuk a plazmidokat, a plazmid-izolálást a Birnboim és Doly gyors alkalikus extrakciós módszerével végezzük [Nucleic Acids Research, 7, 1513-1523 (1979)]. Az 1. ábra 103. számmal jelzett helyén bemutatjuk azt a plazmidot, amely tartalmaz egy 466 bázispárból álló XbaI, BamHI fragmenst, mégpedig a kívánt orientációban. Ezt kiválasztjuk, és a következő lépésben kiindulási lépésként használjuk.

2 μ g, a 2. ábra 103. számmal jelölt helyén bemutatott, egy HindIII (5'-AAGCTT-3') restrikciós hellyel rendelkező plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 2 egység HindIII enzimmel emésztünk 50 μ l alábbi összetételű HindIII-pufferban:

60 mmól nátrium-klorid,
10 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
10 mmól magnézium-klorid, és
6 mmól β -merkaptó-etanol, literenként.

A reakciót 1 órán át végezzük 37 °C hőmérsékleten. Fenol és kloroform elegyével extraháljuk a reakcióelegyet, és az etanollal kicsapott dezoxi-ribonukleinsavat 200 μ l alábbi összetételű pufferban oldjuk:

300 mmól nátrium-klorid,
30 mmól nátrium-acetát, pH = 4,25,
1 mmól cink-klorid, literenként.
200 egység S1-nukleáz. (Miles Laboratories.)

Ez egyszálú dezoxi-ribonukleinsavakat hasít. 1 órán át 15 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd a reakciót fenol és kloroform elegyével végzett extrakcióval és etanolos kicsapással állítjuk le. A plazmidról így eltávolítottuk az egyszálú HindIII enzimmel előállított végeket. A terméket 10 μ l T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz pufferban oldjuk, amelyhez előzőleg 20 pikomól foszforilezett BamHI linkert (5'-CCGGATCCGG-3', Collaborative Research) adtunk, majd a reakcióelegyet 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázzal egészítjük ki. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd ligáz inaktiválására 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. Az elegyet BamHI pufferral

(150 mmól nátrium-klorid, 20 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 8,0, 10 mmól magnézium-klorid, 6 mmól β -merkapto-etanol, literenként. 100 μ l térfogatra hígítjuk, az elegyhez 20 egység BamHI enzimet adunk. 2 órán át 37 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd 1%-os agaróz gélen tisztítjuk. A gélét festjük, és a nagyobb fragmenst (4,5 kb) fagyasztás után eluáljuk, és fenol-kloroform-eleggyel tisztítjuk, és etanollal kicsapjuk. a BamHI kohézív végekkel rendelkező plazmidot 20 μ l, 0,1 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz pufferban oldjuk. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd a dezoxi-ribonukleinsavval E. coli HB101 sejteket transzformálunk. A transzformánsokat ampicillin (Ap^r) rezisztenciára szelektáljuk 100 μ g/ml antibiotikum jelenlétében, és megvizsgáljuk 10 μ g/ml tetraciklinnel szembeni érzékenységet (Tc^s). Az Ap^rTc^s fenotípusú telepekből több plazmidot izolálunk az előzőekben megadott Birnboim-módszerrel. Ezeket megvizsgáljuk a HindIII hely hiánya és az egyetlen BamHI hely jelenléte szempontjából. EcoRI és SalI egymást követő emésztés után 466 és egy 305 bázispárból álló fragmenst kapunk. A második ábra 104. számmal jelölt helyén bemutatott, ezekkel a tulajdonságokkal rendelkező plazmidot szelektálunk, és módosítjuk oly módon, hogy az lpp promotertől balra eső EcoRI helyet eltávolítjuk, és HindIII restrikciós helyé alakítjuk át.

A 2 μ g, a 2. ábra 104. helyén bemutatott plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 100 μ l EcoRI pufferban 0,2 egység EcoRI enzimmal kezelünk 10 percen át, 37 °C hőmérsékleten. A reakció leállítására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. Fenol és kloroform elegyével végzett extrakciót követően a dezoxi-ribonukleinsavat etanollal kicsapjuk, és 200 μ l, 1000 egység/ml S1-nukleáz tartalmazó S1-nukleáz-pufferban oldjuk. 1 órán át 12 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd a reakciót fenol és kloroform elegyével extrahálva leállítjuk, a terméket etanollal kicsapjuk. Ezután 10 μ l, 20 pikomól foszforilezett HindIII linkert (5'-CCAAGCTTGG-3', Collaborative Research) tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz-pufferben szuszpendáljuk a dezoxi-ribonukleinsavat, és 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsavligáz adagolunk. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd a ligáz inaktíváljuk oly módon, hogy 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. Ezután 10 egység HindIII enzimet tartalmazó HindIII pufferrel 150 μ l térfogatra hígítjuk az elegyet. 2 órán át 37 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 1%-os agaróz gélen frakcionáljuk. Etidium-bromiddal festjük a gélét, és legnagyobb csíkot (ekvivalens az egy hasítást szenvedett plazmiddal) elkülönítjük és tisztítjuk. A plazmidot 0,2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó 20 μ l térfogatú T4 ligáz-puf-

ferban oldjuk. A reakciót 16 órán át 4 °C hőmérsékleten végezzük, és E. coli HB101 sejteket transzformálunk az eleggyel. Az ampicillinre rezisztens transzformánsokat szelektáljuk, és Birnboim-módszerrel vizsgáljuk. A plazmid izolátumokat EcoRI (egy hely) és HindIII (egy hely) restrikciós enzimekkel analizáljuk. Szelektáljuk a 2. ábra 105. számmal jelölt helyén bemutatott, egy EcoRI, HindIII fragmenssel (500 bázispár) jellemezhető plazmidot, és ezt használjuk fel klónozó hordozóként az lpp gén 3'-régijának kapcsolásához.

Két μ g, a 3. ábra 105 számmal jelölt helyén bemutatott plazmidot 50 μ l SalI restrikciós pufferban (összetétele a következő: 150 mmól nátrium-klorid, 6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,9 6 mmól magnézium-klorid, 6 mmól β -merkapto-etanol) 2 egység SalI enzimmal kezeljük 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyet 2 egység BamHI restrikciós enzimet tartalmazó BamHI-pufferral 150 μ l-re hígítjuk. Egy órán át 37 °C hőmérsékleten tartjuk az elegyet, majd 2,5 egység alkalikus foszfátot adagolunk, és 1 órán át 65 °C hőmérsékleten folytatjuk az inkutációt. Az elegyet fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapjuk, és a terméket TEN-oldatban oldjuk. A kapott dezoxi-ribonukleinsavat használjuk az lpp 3'-fragmensének klónozására.

Az lpp 3'-régit tartalmazó fragmens előállítására 10 μ g, a 3. ábra 101. számmal jelzett helyén bemutatott pKEN111 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 200 μ l alábbi összetételű HpaI pufferban kezelünk, 10 egység HpaI (5'-GTAAAC-3'): 20 mmól kálium-klorid, 10 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4, 10 mmól magnézium-klorid és 6 mmól β -merkapto-etanol literenként. A reakciót 37 °C hőmérsékleten végezzük, 2 órán át. Az elegyet fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapjuk, és a dezoxi-ribonukleinsavat 10 μ l, 20 pikomól foszforilezett SalI linkert (5'-GGTCGACC-3', Collaborative Research) és 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz-pufferban oldjuk. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubálunk, majd a ligáz inaktíválására 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet. 10 egység SalI enzimet tartalmazó SalI pufferral 100 μ l térfogatra hígítjuk az elegyet, és 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A dezoxi-ribonukleinsavat 300 μ l, 10 egység PvuII restrikciós enzimet tartalmazó, alábbi összetételű PvuII pufferban oldjuk:

60 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,5

6 mmól magnézium-klorid,
6 mmól β -merkapto-etanol, literenként.

1 órán át 37 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd dezoxi-ribonukleinsavat 5%-os poliakril-amid gélen frakcionáljuk.

0,5 µg, 950 bázispárból álló fragmenst kapunk, ezt tisztítjuk, és TEN-oldatban oldjuk. 0,2 µg fragmenst 20 µl, 20 pikomól foszforilezett BamHI linkert (5'-CCGGATCCGG-3', Collaborative Research) és 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz-pufferban oldjuk. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk a reakcióelegyet, majd a ligáz inaktiválására 10 percen át 65 °C hőmérsékleten. A dezoxi-ribonukleinsavat 100 µl-re hígítjuk 20 egység BamHI enzimet tartalmazó BamHI pufferral. 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubálunk, majd dezoxi-ribonukleinsavat 5% poliakrilamidot tartalmazó gélen frakcionáljuk a fő-
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

lős linker molekulák eltávolítására. A BamHI és SallI kohézív végekkel rendelkező 950 bázispárból álló fragmenst elkülönítjük és tisztítjuk. A fragmenst 20 µl, az előzőekben leírt 0,2 µg mennyiségű klónozó vektort és 0,2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz-pufferban oldjuk. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubálunk, majd az eleggyel E. coli HB101 sejteket transzformálunk. A plazmidokat izoláljuk az ampicillinrezisztens transzformánsokból, és vizsgáljuk a 950 bázispárból álló SallI, BamHI fragmens jelenlétét. Az előállítani kívánt, 5,2 kb nagyságú plazmidot pKEN021 jellel jelöljük, és a 3. ábra 106. számmal jelzett helyén mutatjuk be.

10 µg pKEN021 dezoxi-ribonukleinsavat 10 egység BamHI enzimmel kezelünk 1 órán át 37 °C hőmérsékleten, 200 µl alábbi összetételű XbaI/BamHI pufferban:

150 mmól nátrium-klorid,
 10 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 8,
 10 mmól magnézium-klorid,
 6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

Az emésztést 10 egység XbaI enzimmel megismételjük, a reakciót 1 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük. A dezoxi-ribonukleinsavat 1,5 órán át 65 °C hőmérsékleten, 2,5 egység alkalikus foszfatázzal kezeljük, majd fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanolos kicsapással összegyűjtjük, és 50 µl alábbi összetételű TEN-oldatban oldjuk:

10 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
 10 mmól nátrium-klorid,
 1 mmól etilén-dinitril-tetraecetsav, literenként.

A dezoxi-ribonukleinsavat úgy oldjuk, hogy a reakcióelegy µl-enként 0,2 µg-ot tartalmazzon. Ezt a 3. ábra 107. számmal jelölt helyén bemutatott készítményt használjuk plazmid klónozó hordozóként.

A ptrpED50chGH800 jelű plazmidot (lásd a 4. ábra 108. helyét), amit Martial és munkatársai írtak le [Science, 205, 602-607 (1979)], használjuk a humán növekedési hormon gén egy részét meghatározó szekvenciát tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav-fragmens forrásaként. A fragmenst előállítjuk azzal
 10

az ismert módszerrel is, amely szerint a humán agyalapi mirigyből mRNS-t izolálunk, amely a humán növekedési hormont határozza meg. Ezt a módszert Goodman és munkatársai írják le [Methods in Enzymology, 68, 75-90 (1979)]. A ptrpED50chGH800 jelű plazmid humán növekedési hormon gén-része egyetlen SmaI (5'-CCCGGG-3') enzim által felismerhető helyet tartalmaz 6 bázispárral jobbra a gén transzlációs terminációs kodonjától. Ezt a helyet BamHI hellyel cseréltük fel, az alábbiak szerint eljárva:

6 µg plazmidot 6 egység SmaI enzimmel kezelünk 200 µl alábbi összetételű SmaI restriktív pufferban:

15 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 8,0,

6 mmól magnézium-klorid,

15 mmól kálium-klorid, és

6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

A reakciót 1,5 órán át végezzük 37 °C hőmérsékleten. Az emésztés teljessé válását követően fenol és kloroform elegyével extrahálunk, és a dezoxi-ribonukleinsavat etanolos kicsapással különítjük el. A kicsapott dezoxi-ribonukleinsavat 24 µl TEN-oldatban oldjuk. 40 pikomól foszforilezett BamHI adapter fragmenst (Collaborative Research) adunk 0,5 µl (0,2) pikomól fentiekben megadott, emésztett plazmidhoz, 16 µl, 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz tartalmazó ligáz-pufferban. A ligációt 2 órán át 22 °C hőmérsékleten, és ezután 16 órán át 4 °C hőmérsékleten végezzük. A T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz inaktiválására a reakcióelegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. Ezután BamHI kohézív végeket állítunk elő oly módon, hogy 20 egység BamHI enzimet tartalmazó BamHI pufferral 40 µl végtérfogatra hígítjuk az elegyet, és 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Az enzim hasítja a linker szekvenciát és azt a BamHI helyet is, amely a humán növekedési hormon klónozott cDNS-szekvenciájának kezdetén van. Ily módon 691 bázispárból álló fragmenshez jutunk, amelynek kohézív BamHI végei vannak. Ezt 6%-os poliakrilamid gélen elkülönítjük, és a távoli hullámhosszúságú ultraibolya fényben vizsgáljuk, miután 1 µl/ml töménységű etidium-bromid-oldattal festettük. A fragmenst tartalmazó gél kivágjuk, és a dezoxi-ribonukleinsavat egy dialízis zsákba gyűjtjük össze elektroelúcióval. Ezután etanolos kicsapást végzünk. A kicsapott dezoxi-ribonukleinsavat centrifugálással elkülönítjük, TEN-oldatban oldjuk, az oldatot fenol és kloroform elegyével extraháljuk, az etidium-bromid eltávolítására; végül etanollal kicsapjuk. Az elkülönített dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst 0,2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázzal az előzőekben megadott 20 µl térfogatú ligációs pufferban 0,2 µg pBR322 plazmiddal (lásd a 4. ábra 102. helyét) kapcsoljuk össze. A pBR322 plazmidot előzőleg az egyetlen BamHI helyen hasítottuk, és alkalikus foszfatázzal kezeltük. 16 órán át 4 °C

hőmérsékleten folytatjuk a reakciót, majd az eleggyel *E. coli* JA221 törzset (recA⁻, hrs⁻ hsm⁻, ΔtrpE5, thr⁻, leu⁻, thi⁻, lacY⁻) transzformálunk. A törzs letéti száma: NRRL 15 014. A transzformáció során Wensink és munkatársai módszerét használtuk [Cell, 3, 315-325 (1974)]. A transzformált telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó agarlemezekeken szelektáljuk. A dezoxi-ribonukleinsavat 16 ampicillin-rezisztens telepéből izoláljuk, az előzőleg megadott Birnboim-módszert, azaz a gyors alkalikus-denaturációs módszert használva. Ezután restrikciós enzimmel és gél-elektroforézissel végzünk analízist. A 16 vizsgált plazmid közül 11 tartalmazza a körülbelül 700 bázispárból álló BamHI fragmenst. A plazmidok egyikét pNM575 jellel jelöljük, és a 4. ábra 109. helyén mutatjuk be. Ezt a plazmidot használjuk amplifikálásra (sokszorosításra) a következőkben ismertetett plazmidok előállításakor használt dezoxi-ribonukleinsav-fragmens forrásaként. Az érett humán növekedési hormon dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciája egyetlen FnuDII (5'-CGCG-3') restrikciós helyet tartalmaz, ez 47 bázispárral arrébb helyezkedik el az első nukleotidtól számítva. A pBR322-ben 23 ezen enzim által felismerhető hely van. 25 µg pNM575 dezoxi-ribonukleinsavat 25 egység BamHI enzimmel kezelünk, 250 µl BamHI pufferban. A reakciót 1 óráig át végezzük 37 °C hőmérsékleten. A 691 bázispárból álló és BamHI kohézív végekkel rendelkező fragmenst 6% poliakril-amid gélről izoláljuk, és az előzőekben megadottak szerint eljárva tisztítjuk. A fragmens 1/3-át (ez 8 µg plazmidnak felel meg) tisztítás után 2,5 egység FnuDII enzimmel emésztjük 100 µl FnuDII pufferban. Ennek összetétele a következő:

6 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
6 mmól magnézium-klorid,
6 mmól β-merkapto-etanol, literenként.

XbaI

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGTTCCCAACCATTCCTTATCC-
3'- TCCCATAATTATTACAAGGGTGGTAAGGGAATAGG-

ThaI

AGGCTTTTGGACAACGCTATGCTCCG 3'
TCCGAAAACTGTTGCGATACGAGGC 5'

A fragmenst az ismert foszfotriészter-módszerrel állítottuk elő, az alábbi szegmensekből:

- 1) CTAGAGGGTAT
- 2) TAATAATGTTCC
- 3) CAACCATTCCT
- 4) TTATCCAGGC
- 5) TTTTGGACAACG
- 6) CTATGCTCCG
- 7) CATTATTAATACCT
- 8) GGTTGGGAA
- 9) GGATAAGGGAAT
- 10) GTCAAAAAGCCT
- 11) CGGAGCATAGCGTT.

A reakciót 37 °C hőmérsékleten végezzük, 1,5 óráig át. Az 538 bázispárból álló, az utolsó 175 aminosavat meghatározó szakaszt és az ezután következő transzlációs stop kodont tartalmazó fragmens izolálását 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen végzett elektroforézissel ismert módon vitelezzük ki.

1. példa

Plazmid előállítása a metionil-humán növekedési hormon kifejezésére az *E. coli* lipoprotein promotert használva

A) A plazmid előállítása

Foszfotriészter-módszerrel szintetizáljuk az 5. ábra 110. számmal jelzett helyén megadott kétszálú dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst. A fragmenst felhasználjuk az lpp promoter szakaszának kapcsolásához a humán növekedési hormont meghatározó régióhoz, a humán növekedési hormon közvetlen kifejezése céljából. A felső szál 66 nukleotidból áll, ez tartalmazza az 5'-végen az XbaI hasítás során létrejött 4 nukleotidból álló egyszálú szekvenciát. Az alsó szál 62 nukleotidot tartalmaz, ez a felső szál 62 nukleotidjával komplementer. A szintetikus dezoxi-ribonukleinsav-fragmens első része követi az lpp gén természetes szekvenciáját az XbaI restrikciós helytől kezdődően a riboszóma kötőhelyen át a transzláció kezdetét meghatározó metionin kodonig (19 bázispár), és ezután következik a humán növekedési hormon első 47 nukleotidja, egészen az előzőekben megadott egyetlen FnuDII helyig.

Az 5. ábra 110. helyén megadott kétszálú dezoxi-ribonukleinsav-fragmens az alábbi szerkezetű:

A fentiekben megadott szegmensek felhasználásával az alábbi három duplexet állítjuk elő.

- 50 a) Az 5'-nem-foszforilezett 1. szegmenst T4 ligázal 5'-foszforilezett 7. szegmens jelenlétében hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 2. szegmenshez. Ily módon ismert módszerek szerint eljárva [Brown és munkatársai, Methods in Enzymology, 68, 109-151 (1979)] megkapjuk az 1. duplexet. A duplexet preparatív gél-elektroforézissel izoláljuk 15%-os poliakril-amidon.
- 55 b) A 3. 5'-foszforilezett szegmenst T4 ligázal 5'-foszforilezett 8. és 9. szegmens jelenlétében hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 4. szegmenshez, amiután megkapjuk a 2. duplexet. Ezt 15%-os poliakril-amidon preparatív gél-elektroforézissel izoláljuk. A reakciót a fentiek szerint végezzük.

c) Az 5. 5'-foszforilezett szegmenst T4 ligázal 5'-foszforilezett 10. szegmens és 5'-nem-foszforilezett 11. szegmens jelenlétében ligáljuk a 6. szegmens 5'-foszforilezett alakjához, amiután megkapjuk a 3. duplexet. A duplexet 15%-os poliakril-amidon preparatív gél-elektroforézissel izoláljuk.

Az 1., 2. és 3. duplexeket ezután T4 ligázal összekapcsoljuk, miután megkapjuk az 5. ábra 110. helyén megadott kétszálú dezoxi-ribonukelinsav-szegmenst, amit 15%-os poliakril-amidon preparatív gél-elektroforézissel izolálunk. Ezt a terméket 5'-végein T4 polinukleotid-kinázzal (gamma-P³²)ATP jelenlétében enzimatikusan foszforilezzük.

A reakciót ismert módszerekkel végezzük.

A kifejeződő plazmid előállítására 0,1 pikomól (0,4 µg) plazmid vektort (5. ábra 107. helyén adjuk meg), 3,2 pikomól szintetikus dezoxi-ribonukelinsav-fragmenst (5. ábra, 110.) és 0,24 pikomól (0,08 µg) 538 bázispárból álló fragmenst (lásd az előzőeket, 5. ábra, 109.) 2 egység T4 dezoxi-ribonukelinsav-ligázal enzimatikusan kapcsolunk 14 µl ligációs pufferban. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet, majd az előzőekben megadottak szerint eljárva, *E. coli* JA221 sejteket transzformálunk. A transzformált telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó agarlemezeken szelektáljuk. Az előzőekben megadott Birnboim-módszerrel 10 telepből izoláljuk a plazmidokat. A plazmidokat XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd akril-amid gél-elektroforézist végzünk, amiután úgy találjuk, hogy egy plazmid tartalmazza a várt, 604 bázispárból álló fragmenst. Ezt a plazmidot sokszoroztjuk, és az XbaI helytől az FnuDII helyig terjedő dezoxi-ribonukelinsav-szekvenciát Maxam és Gilbert módszerével meghatározzuk [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560-564 (1977)]. A szekvencia korrekt. A plazmidot pNM645 jellel jelöljük, és az 5. ábra 111. helyén ismertetjük.

B) A humán növekedési hormon kifejezése

A pNM645 plazmid által *E. coli* JA221 sejtekben kifejezett humán növekedési hormont módosított, szilárd fázisú radioimmun-méréssel mutatjuk ki [a módszert lásd az alábbi közleményekben: Broome és Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 2746-2749 (1978); Hitzeman és munkatársai; ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, 14, 57-58 (1979); és Erlich és munkatársai, Cell., 13, 681-689 (1978)].

A baktériumsejt proteinjének nátrium-dodecilszulfát-poliakril-amid gélanalízist Leammler szerint végezzük [Nature, 227, 680-685 (1970)], a vizsgálatok szerint egy körülbelül 20 000 dalton molekulású nagy protein csik jelenik meg. A csik az összprotein legalább 10%-át képviseli, ugyanakkor nincs jelen a pKEN021 plazmidot tartalmazó

E. coli JA221 készítményekben. A kvantitatív kifejeződést standard radioimmun-méréssel vizsgáltuk [Twomey és munkatársai, Clin. Chem., 20, 389-391 (1974)]. A vizsgálatok szerint sejtként legalább 2 millió molekula van jelen. A metionil-humán növekedési hormon 500 g *E. coli* sejtéből részlegesen tisztítjuk 8 mól/l karbamid és 1% Triton X100 extrakcióval. A sejtörmelékét centrifugálással eltávolítjuk, és az oldódó növekedési hormont tartalmazó felülúszót Whatman DE52 oszlopon frakcionáljuk. A terméket tartalmazó frakciókat radioimmun-méréssel (RIA) határozzuk meg, ezeket összegyűjtjük és izoelektromos kicsapást végzünk. A terméket Whatman SE53 oszlopon tovább tisztítjuk. Radioimmun-méréssel meghatározzuk a terméket tartalmazó frakciókat, és az anyagot izoelektromos kicsapással vagy ultraszűrővel töményítjük.

A kinyert metionil-humán növekedési hormon biológiai aktivitását hipofízis-ektomizált nőtény patkányokban határozzuk meg Greenspan és munkatársai szerint [Endocrinology, 45, 455-463 (1948)]. Aktivitása azonos volt a humán növekedési hormon aktivitásával.

2. példa

A metionil-marha növekedési hormon kifejezésére alkalmas plazmid előállítása az *E. coli* lipoprotein promotor felhasználásával.

A 6. ábra 111. számmal jelzett helyén megadott pNM645, a metionil-humán növekedési hormon kifejezésére használt plazmidot használjuk fel a metionil marha növekedési hormon kifejezésére alkalmas plazmid előállítására.

A marha növekedési hormon génjeinek egy részét meghatározó szekvenciát tartalmazó két dezoxi-ribonukleinsav-fragmens forrásként a Miller és munkatársai által leírt pBP48 plazmidot használjuk [J. Biol. Chem., 225, 7521-7524 (1980)]. A plazmid a marha növekedési hormont meghatározó szekvenciát egy 831 bázispárból álló szakaszon tartalmazza, ezt a pBP322 PstI (5'-CTGCAG-3') restrikciós helye hordozza. A marha növekedési hormont meghatározó szekvenciát Miller és munkatársai módszere mellett megkaphatjuk Goodman és munkatársai szerint eljárva is, a marha agyalapi mirigyéből izolált mRNS segítségével [Methods in Enzymology, 68, 75-90 (1979)].

A humán és a marha növekedési hormont meghatározó szekvencia igen hasonló, és sok homológiát mutat. A marha növekedési hormont kifejező plazmid előállításakor különösen előnyösen használhatjuk azokat a fragmenseket, amelyeket a PvuII restrikciós enzimmel (5'-CAGCTG-3') végzett emésztéssel kapunk. A keletkező fragmensek 497 bázispárból állnak a humán növekedési hormon, és 494 bázispárból a marha növekedési hormon

esetén. A megfelelő restriktációs helyek mindkét szekvenciában azonos kódoló helyen helyezkednek el.

Molekulánként 3 PvuII helyet tartalmazó, 10 µg, a 6. ábra 111. helyén megadott pNM645 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat egy egység PvuII enzimmel kezelünk, 200 µl alábbi összetételű PvuII restriktációs pufferral készült reakcióelegyben:

- 60 mmól nátrium-klorid
- 6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,5
- 6 mmól magnézium-klorid,
- 6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

A reakciót 10 percen át 37 °C hőmérsékleten végezzük. A reakció leállítására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk, majd dezoxi-ribonukleinsavat alkalikus foszfatazzal kezeljük. Ez a limitált emésztés a jelenlévő PvuII helyek felének-kétharmadának a hasadásához vezet. A fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen szeparáljuk, és a 6. ábra 113. számmal jelzett helyén bemutatott, a 497 bázispárból álló PvuII fragmenst elveszett lineáris plazmidnak megfelelő dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst (valamivel gyorsabban mozdul el, mint az egyetlen hasadást szenvedett plazmid) kivágjuk a gélből, tisztítjuk és a köztes pNM685 plazmid előállítására vektorként használjuk fel (a plazmidot a 6. ábra 114. helyén mutatjuk be).

A pBP348 plazmidból előállítunk egy 494 bázispárból álló PvuII fragmenst. 10 µg plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 200 µl PvuII pufferban 10 egység PvuII enzimmel kezelünk, 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten. A fragmenseket 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen különítjük el, és a 494 bázispárból álló fragmenst (6. ábra 112.) előzőekben megadott módszereket használva tisztítjuk.

Előállítjuk a 6. ábra 114. számmal jelzett helyén megadott köztes pNM685 plazmidot oly módon, hogy 0,2 µg 113 jelű vektort 0,05 µg, 494 bázispárból álló fragmenssel ligálunk 20 µl T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz pufferban, amelyhez 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz adunk. A reakciót 16 órán át végezzük 4 °C hőmérsékleten. Transzformációt és az ampicillinre rezisztens transzformánsok szelekcióját követően plazmidokat izolálunk az előzőekben megadott Birnboim-módszert használva. A plazmidokat megvizsgáljuk a 494 bázispárból álló PvuII fragmens jelenlétére. Az XbaI és az SmaI enzimekkel végzett egymást követő emésztéssel meghatározzuk a fragmens megfelelő orientációját. A marha növekedési hormon szekvencia 494 bázispárból álló PvuII fragmense

egyetlen aszszimetrikus SmaI restriktáció helyet tartalmaz. A pNM645 szülőplazmid SmaI helyet nem tartalmaz. Köztes plazmidként kiválasztunk egy 494 bázispárból álló PvuII fragmenst, és egy 416 bázispárból álló XbaI, SmaI fragmenst tartalmazó plazmidot.

A 7. ábra 114. helyén bemutatott pNM685 plazmidot az alábbiak szerint eljárva átalakítjuk marha növekedési hormont kifejező képes plazmiddá:

Úgy járunk el, hogy

- 1) a humán növekedési hormon első 22 aminosavját meghatározó szekvenciát eltávolítjuk, és kicseréljük a marha növekedési hormon első 23 aminosavát meghatározó szekvenciára, és
- 2) a második PvuII hely és a stop kodon közötti rövid szekvenciát (ez humán növekedési hormon szekvencia) kicseréljük egy olyan szintetikus fragmenssel, amely visszaállítja az alanin kodont, azaz megadja a marha növekedési hormon 190. aminosavának kodonját.

10 µg pNM685 plazmidot egy egység PvuII enzimmel kezelünk 200 µl PvuII pufferban. A reakciót 5 percen át végezzük 37 °C hőmérsékleten. A reakció leállítására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. A fragmensek keverékét 1% agarózt tartalmazó gélen frakcionáljuk, és a molekulánként csak egyetlen PvuII hasítási helyet tartalmazó lineáris plazmidot izoláljuk és tisztítjuk. Az elkülönített 3 µg-nyi mennyiségű anyagot 5 egység XbaI enzimmel teljesen emésztjük, és alkalikus foszfatazzal kezeljük. A fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen frakcionáljuk, és a legnagyobb fragmenst elkülönítjük és klónozó vektorként használjuk fel. A 7. ábra 115. számmal jelzett helyén megadott termék az XbaI hely és a humán és marha növekedési hormon első PvuII helye közötti lévő, 85 bázispárból álló fragmenst elvesztette.

A marha növekedési hormon első 23 aminosavát (69 bázispár) reprezentáló dezoxi-ribonukleinsav-szekvencia az első PvuII helyig két HpaII restriktációs enzim által felismerhető helyet tartalmaz (5'-CCGG-3'). Az első hely 23 bázispárnyi távolságban van a kódoló szekvencia első nukleotidjától. A foszforészter-módszert használva szintézissel előállítunk egy olyan, 42 bázispárból álló fragmenst, amelyet a 7. ábra 116. helyén mutatunk be, és amely megfelel annak a 19 bázispárból álló szekvenciának, amely az lpp riboszóma kötőhelyen lévő XbaI helytől az ATG iniciációs kodonig terjed, és amelyet a marha növekedési hormon első 23 bázispárból álló szekvenciája követ.

A fragmens az alábbi szerkezetű:

XbaI

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGGCTTTTCCGGCTATGTCTCTGTC-3'
3' TCCATAATTATTACCGAAAAGGCCGATACAGAGACAGGC 5'

HpaII

A 42 bázispárból álló fragmens előállítására az alábbi hat szegmenst állítjuk elő:

- 1) CTAGAGGGTAT
- 2) TAATAATGGCTTTTC
- 3) CGGCTATGTCTCTGTC
- 4) CATTATTAATACCCCT
- 5) TAGCCGGAAGG
- 6) CGGACAGAGACA.

A fentiek szerint előállított szegmenseket használva, az 5'-foszforilezett 2. szegmenst, az 5'-foszforilezett 3. szegmenst, az 5'-foszforilezett 5. szegmenst és a hat 5'-nem-foszforilezett szegmenst, T4 ligázzal összekapcsoljuk, amiután egy duplexet kapunk. Ezt 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk. A duplexhez hozzákapcsoljuk az 5'-nem foszforilezett 1. szegmenst, és az 5'-foszforilezett 4. szegmenst T4 ligázzal. A 7. ábra 116. helyén megadott és a fentiek szerint előállított 42 bázispárból álló dezoxi-ribonukleinsav-duplexet 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézist végezve tisztítjuk. A duplexet ezután 5'-végein T4 polinukleotid-kinázt és (gamma-p³²) ATP-t használva enzimatikusan foszforilezzük, ismert módszerek szerint eljárva.

A pBP348 eredeti plazmidból előállítjuk a fentiekben megadott HpaII helytől a PvuII helyig terjedő 46 bázispárból álló dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst. 100 µg plazmidot 400 µl PvuII pufferban 50 egység PvuII enzimmel kezelünk, 2 órán át, 37 °C hőmérsékleten. Fenolos extrakciót és etanolos kicsapást követően a dezoxi-ribonukleinsavat 400 µl PstI (5'-CTGCAG-3') pufferban oldjuk. A puffer összetétele a következő:

- 50 mmól nátrium-klorid,
- 6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
- 6 mmól magnézium-klorid,
- 6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

Az oldott terméket 50 egység PstI enzimmel kezeljük, 2 órán át, 37 °C hőmérsékleten. 6% poliakril-amidot tartalmazó, 30 cm hosszú gélen szeparáljuk, a dezoxi-ribonukleinsav-fragmenseket, és az adott 46 bázispárból álló szekvenciát tartalmazó, 135 bázispárból álló fragmenst izoláljuk, és ismert módszerrel tisztítjuk. A kapott, 33 µg plazmiddal ekvivalens dezoxi-ribonukleinsav 1/3 részét HpaII restriktionsenzimel részlegesen emésztjük. A dezoxi-ribonukleinsav emésztését 100 µl HpaII pufferban végezzük, amelynek összetétele a következő:

- 20 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
- 7 mmól magnézium-klorid, és
- 6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

Az emésztést 1 egység HpaII enzimmel végezzük, 37 °C hőmérsékleten, 40 percen át. A reakciót úgy állítjuk le, hogy az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. A dezoxi-ribonukleinsav-fragmenseket 5% akril-amidot tartalmazó gélen futtatjuk. Egy kü-

lönálló csikon 1 µg SauIII restriktionsenzimel emésztett pBR322 dezoxi-ribonukleinsavat elektroforetizálunk. A fragmensek egye egy 46 bázispárból álló fragmenst tartalmaz, ezt markerként használjuk.

A 46 bázispárból álló fragmens a 135 bázispárból álló fragmens HpaII részleges emésztésekor keletkezik (ez utóbbit a 7. ábra 112. helyén adjuk meg). A fragmenst ismert módszerekkel tisztítjuk.

A 7. ábra 115. helyén megadott, XbaI és PvuII végekkel rendelkező, 0,2 µg plazmid vektort 1,6 pikomól szintetikus, 42 bázispárból álló és a 7. ábra 116. számmal jelölt helyén megadott fragmenssel elegyítünk, majd az elegyhez hozzáadunk a 7. ábra 112. helyén megadott 0,5-1 pikomól, 46 bázispárból álló fragmenst. A 10 µl térfogatú ligációs pufferben 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázzal végezzük a ligációs reakciót, 16 órán át, 4 °C hőmérsékleten. Az eleggyel E. coli JA221 sejteket transzformálunk, és a plazmidokat az ampicillin-rezisztens telepekből izoláljuk. A plazmidokat megvizsgáljuk a 494 bázispárból álló PvuII és a 88 bázispárból álló XbaI, PvuII fragmens jelenlétére. A 36 analízált telep közül 18 rendelkezik ezekkel a fragmensekkel. Két plazmidot szekvenálunk az XbaI helytől a PvuII helyig, és radioimmun-méréssel teszteljük marha növekedési hormonra. Az egyik a radioimmun-mérés során pozitív eredményt adott, és a megfelelő szekvenciával rendelkezik. Ezt a plazmidot a 7. ábra 117. helyén adjuk meg, és pNM797 jellel jelöljük. Standard radioimmun-méréssel mérjük a kvitatív kifejeződést, és úgy találjuk, hogy sejtenként legalább 10⁵ molekula marha növekedési hormon van jelen.

A 8. ábra 117. helyén megadott pNM797 plazmid egy aminosav kodon cseréjét igényli a marha növekedési hormon teljes kódolása érdekében. A cserét úgy végezzük, hogy pNM797 fragmens PvuII-től a BamHI helyig terjedő, 28 bázispárból álló fragmensét kihasítjuk, és az alábbi, és a 8. ábra 118. helyén megadott szintetikus kétszálú fragmenssel helyettesítjük (a felső szálon 13, az alsó szálon 17 bázispárt tartalmaz):

- 5' CTGTGCCTTCTAG 3'
- 3' GACACGGAAGATCCTAG 5'.

10 µg pNM797 dezoxi-ribonukleinsavat 1 egység PvuII enzimel kezelünk, 200 µl PvuII pufferban, 5 percen át, 37 °C hőmérsékleten. Az enzim inaktiválására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. A mintákat BamHI pufferral 300 µl-re hígítjuk, és 10 egység BamHI enzimel 1 órán át 37 °C hőmérsékleten teljesen emésztjük. Ezután 5 egység alkalikus foszfátot adagolunk, és 1 órán át 65 °C hőmérsékleten folytatjuk az inkubálást. A dezoxi-ribonukleinsav-fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen különítjük el, és tisztítjuk az egyetlen vágást

szenvedett, a 8. ábra 119. helyén megadott dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst. 0.2 µg fragmenst 5 pikomól szintetikus fragmenssel ligálunk 2 egység T4 ligáz jelenlétében, 20 µl ligáz-pufferban, 1 éjszakán át, 4 °C hőmérsékleten. Transzformációt és az előzőekben ismertetett Birnboim plazmid izolálását követően több olyan plazmidot szelektálunk, amely tartalmazza a megfelelő nagyságú PvuII fragmenst (494 bázispár), és XbaI, BamHI fragmenst (604 bázispár). Legalább két termék szekvenciáját a BamHI helytől az egyetlen SmaI helyig meghatározzuk, és egyet kiválasztunk, amelynek megfelelő a szekvenciája. Ezt a 8. ábra 120. számmal jelzett helyén mutatjuk be.

3. példa

Az 1. példában megadottak szerint előállított plazmid variációja.

A pNM645 (9. ábra 111.) plazmid tetraciklin-rezisztenciát biztosító variációját állítjuk elő oly módon, hogy a BamHI és Sall restrikciós helyek között lévő lpp 3'-szekvenciát a pBR322 (9. ábra 102.) plazmidból származó dezoxi-ribonukleinsav-fragmenssel cseréljük ki. A pBR322 plazmidban a tetraciklin-rezisztencia egy olyan gén által biztosított, amelynek promoterét HindIII enzimmel (5'-AAGCTT-3') hasíthatjuk. A gén kódoló szakasza ennek közelében kezdődik, és a plazmid BamHI és Sall restrikciós helyéig tart. A tetraciklin promotert HindIII emésztéssel és S1 nukleázos kezeléssel roncsoljuk oly módon, hogy az egyszálú végeket eltávolítjuk. 5 µg pBR322 dezoxi-ribonukleinsavat 10 egység HindIII enzimmel kezelünk 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten, az alábbi összetételű, 200 µl HindIII pufferban:

60 mmól nátrium-klorid,
20 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
10 mmól magnézium-klorid és
6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

A dezoxi-ribonukleinsavat ezután fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapjuk és 300 µl S1 pufferban szuszpendáljuk. A puffer összetétele a következő:

300 mmól nátrium-klorid,
25 mmól nátrium-acetát, pH = 4,25,
1 mmól cink-klorid, literenként.

Az S1 nukleázt 1000 egység/ml koncentrációban adagoljuk, és az elegyet 1 órán át 15 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A terméket fenol és kloroform elegyével extraháljuk, és az etanollal kicsapott dezoxi-ribonukleinsavat 200 µl alábbi összetételű Sall restrikciós pufferban oldjuk:

150 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,9,
6 mmól magnézium-klorid,
6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

Az emésztést 5 egység Sall enzimmal végezzük, 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten. Az elegyet 6% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel frakcionáljuk, és izoláljuk a keletkezett 617 bázispárból álló fragmenst. A fragmens tisztítását az előzőekben megadtak szerint végezzük. 5 µg pNM645 dezoxi-ribonukleinsavat 5 egység BamHI enzimmal kezelünk, 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten. A terméket fenol és kloroform elegyével extraháljuk, és etanollal kicsapjuk, majd dezoxi-ribonukleinsavat TEN-oldatban oldjuk. 2 µg, BamHI kohézív végekkel rendelkező pNM645 dezoxi-ribonukleinsavat tompa végű dezoxi-ribonukleinsavvá alakítunk oly módon, hogy 1 egység E. coli dezoxi-ribonukleinsav-polimeráz I enzim nagy fragmensével feltöltjük. A feltöltést 20 µl alábbi összetételű dezoxi-ribonukleinsav-polimeráz I pufferban végezzük:

70 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,6,
10 mmól magnézium-klorid,
10 mmól β-merkaptó-etanol és
0,5-0,5 mmól dATP, dCTP, dGTP és dTTP, literenként.

A reakciót 1 órán át végezzük 15 °C hőmérsékleten. Az enzimet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten denaturáljuk, és dezoxi-ribonukleinsavat Sall puffer és 3 egység Sall restrikciós enzim adagolásával hasítjuk. Az emésztést 1 órán át végezzük 37 °C hőmérsékleten. A dezoxi-ribonukleinsavat 1% agarózt tartalmazó gélen frakcionáljuk, és a nagy plazmid fragmenst fagyasztaást követően eluáljuk a gélről. Az etidium-bromidot és az agaróz fragmenseket fenol és kloroform elegyével extrahálva eltávolítjuk és etanolos kicsapást végzünk. A plazmidot 20 µl TEN-oldatban oldjuk. 0,2 µg (0,05 pikomól) plazmid vektort 0,2 µg (0,05 pikomól) 617 bázispárból álló fragmenshez ligálunk, az előzőekben megadott körülmények között. Az eleggyel E. coli JA221 telepeket transzformálunk, és 100 µg/ml ampicillint és 15 µg/ml tetraciklint tartalmazó agar-lemezekken szelektálunk. Izoláljuk a 9. ábra 121 helyén megadott pNM736 jellel jelzett plazmidokat, ezek a restrikciós enzim analízis szerint az adott szekvenciát tartalmazzák. A metionil-humán növekedési hormon kifejezése a pNM645 plazmidnál találattal azonos.

4. példa

A Met-Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-humán növekedési hormont kifejező plazmid előállítására és felhasználására szubszt rátként szelektív enterokináz (3. 4. 21. 9) hasításra érett humán növekedési hormon előállítására.

Foszfotriészter-módszerrel szintetizálunk egy kétszálú, a 10. ábra 122. számmal jelzett helyén megadott dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst, és hozzákapcsoljuk egy olyan lpp promotert régióhoz, amely megelőzi a

start kodonnal kezdődő humán növekedési hormont kódoló szakaszt, és amiután egy, az enterokináz által felismert és hasított szekvenciát meghatározó rövid peptidet leíró kódoló szakasz következik. A felső szál 90 nukleotidból áll, ez az 5'-végén XbaI hasítást követően kapott 4 nukleotidból álló egy-szálú részt hordoz. Az alsó szál olyan 86 nukleotidból áll, amely komplementer a felső szál utolsó 86 nukleotidjával. A szintetikus, 10 dezoxi-ribonukleinsav-fragmens első részét

XbaI

5' CTAGAGGGTATTAATAATGTTCCCATTTGGATGATGATGATAAGTTCCCAA-
TCCCATAATTATTACAAGGGTAACCTACTACTACTATTCAAGGGTT-

FnuDII

CCATTCCCTTATCCAGGCTTTTGTGACAACGCTATGCTCCG 3'
GGTAAGGGAATAGGTCCGAAAACTGTTGCGATACGAGGC 5'

A fragmenst az ismert foszfo-triészter-módszerrel állítjuk elő, az alábbi szegmensek közül:

- 1) CTAGAGGGTAT
- 2) TAATAATGTTCC
- 3) CATTGGATGAT
- 4) GATGATAAGTTCC
- 5) CAACCATTTCC
- 6) TTATCCAGGC
- 7) TTTTGTGACAACG
- 8) CTATGCTCCG
- 9) CATTATTAATACCCT
- 10) ATGGGAA
- 11) CTTATCATCATCCA
- 12) GGTGGGAA
- 13) GGATAAGGGAAT
- 14) GTCAAAAAGCCT
- 15) CGGAGCATAGCGTT.

A fenti szegmenseket használva T4 ligázzal sorrendben elvégezzük az alábbi kötő-reakciókat:

- a) Az 1. 5'-nem-foszforilezett szegmenst hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 2. szegmenshez 5'-foszforilezett 9. szegmens jelenlétében T4 ligázzal, amiután megkapjuk az 1. dezoxi-ribonukleinsav-duplexet (Brown és munkatársai, *Methods in Enzymology*, 68, 109-151, 1979). A duplexet preparatív gélelektroforézissel izoláljuk 15%-os poliakril-amidon.
- b) Az 5'-foszforilezett 3. szegmenst 5'-foszforilezett 11. szegmens jelenlétében T4 ligázzal hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 4. szegmenshez, amikor megkapjuk a 2. dezoxi-ribonukleinsav-duplexet, amit 15%-os poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk.
- c) Az 5'-foszforilezett 5. szegmenst 5'-foszforilezett 12. és 13. szegmensek jelenlétében T4 ligázzal hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 5. szegmenshez, amikor megkapjuk a 3. dezoxi-ribonukleinsav-duplexet, amit 15%-os poliakril-

az lpp gén természetes szekvenciája követi, a riboszóma kötőhely XbaI restrikciós helyétől a 19 bázispárból álló transzlációs iniciációs metionin kodonig, majd ezután következik az enterokináz hasítási helynek megfelelő szekvencia, és a humán növekedési hormon első 47 nukleotidja az előzőekben megadott egyetlen FnuDII helyig.

A 10. ábra 122 helyén megadott két-szálú dezoxiribonukleinsav-fragmens az alábbi szerkezetű:

-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk.

d) Az 5'-foszforilezett 7. szegmenst 5'-foszforilezett 14. és 5'-nem-foszforilezett 15. szegmens jelenlétében hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 8. szegmenshez T4 ligázzal, amikor megkapjuk a 4. dezoxi-ribonukleinsav-duplexet, amit 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk.

e) Ezután a 2., 3. és 4. dezoxi-ribonukleinsav-duplexeket T4 ligázzal 5. dezoxi-ribonukleinsav-duplexszé kapcsoljuk össze, a terméket 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk.

f) Az 1. dezoxi-ribonukleinsav-duplexhez T4 ligáz jelenlétében hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 10. szegmenst, és az 5. dezoxi-ribonukleinsav-duplexet, a kapott és a 10. ábra 110. helyén bemutatott dezoxi-ribonukleinsav-duplexet ezután 10% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk. Ezt a dezoxi-ribonukleinsav-duplexet T4 polinukleotid-kináz és (gamma-p³²)ATP jelenlétében ismert módszerrel enzimatikusan foszforilezzük.

A kifejeződő plazmid előállítására enzimatikusan összekapcsoljuk 0,1 pikomól (0,4 µg) plazmid vektort (5. ábra 107.), 0,025 pikomól szintetikus dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst (5. ábra 110.) és 0,3 pikomól (0,08 µg) 538 bázispárból álló fragmenst (10. ábra 109., lásd az előzőekben). A reakciót 24 µg ligációs pufferban végezzük 1,5 egy-ség T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázzal. 16 órán át 4 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet, majd az előzőekben megadottak szerint eljárva *E. coli* JA221 sejteket transzformálunk. A transzformált telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó agar-lemezen szelektáljuk. 19 telepéből izoláljuk Birnboim módszerével (lásd előbb) a plazmidokat. XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel való emésztést és akrilamid gélelektroforézist kö-

vetően úgy találtuk, hogy 12 plazmid tartalmazza a várt 628 bázispárból álló fragmenst.

A pozitív plazmidok közül nyolcat XbaI és ezután PvuII enzimmel kezelünk, hét egy 109 bázispárból álló fragmenst adott. Az egyik plazmid szekvenciáját Maxam és Gilbert módszerével megállapítottuk [Proc. Natl. Sci., USA, 74, 506-564 (1977)], és azt pontosnak találtuk. A plazmidot pNM702 jellel jelöljük, és a 10. ábra 123 helyén ismertetjük. A humán növekedési hormon kifejezését standard radioimmun-méréssel határozzuk meg [Towmey és munkatársai, Clin. Chem., 20, 389-391 (1974)].

A kvantitatív kifejeződés-vizsgálat szerint sejtenként legalább 2 millió molekula keletkezik.

500 g E. coli sejtéből részlegesen tisztítjuk a Met-phe-pro-leu-(asp)-lys-humán növekedési hormont, oly módon, hogy 8 mólos karbamiddal és 1% Triton X100-zal extrahálunk. A sejttörmelékcentrifugálással eltávolítjuk, és az oldódó humán növekedési hormont tartalmazó felülúszót Whatman DE52 oszlopon frakcionáljuk. A radioimmun-méréssel meghatározott aktivitást tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és izoelektromos kicsapást végzünk. A terméket Whatman SE53 oszlopon tovább tisztítjuk. A frakciók közül a terméket tartalmazókat radioimmun-méréssel kiválasztjuk, és a terméket izoelektromos kicsapással vagy ultraszűrőssel töményítjük.

A részlegesen tisztított terméket enterokináz enzimmel hasítjuk. A Miles Laboratories nyers sertés enterokinázát Anderson és munkatársai módszerével [Biochemistry, 16, 3354-3360 (1977)] tovább tisztítjuk. Az enterokinázát a szubsztráttal együtt inkubáljuk, és időközönként mintákat veszünk, amelyeket izoelektromos fókuszáló gélen vizsgálunk. A kiindulási anyag izoelektromos pontja 4,3, ez az idővel változik, végül eléri a humán növekedési hormon 4,91 izoelektromos pontját.

5. példa

A Met-Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Lys-marha növekedési hormont kifejező plazmid előállítására E. coli lipoprotein promoter felhasználásával

A 11. ábra 123. helyén bemutatott pNM702 plazmid a humán növekedési hormont kifejező plazmid. Kiindulási anyagként ezt használjuk fel a Met-Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-marha növekedési hormont kifejező plazmid előállítására. A Miller és munkatársai által leírt [J. Biol. Chem., 255, 7521-7524 (1980)] és a 11. ábra 124. helyén bemutatott pBP348 plazmidot használjuk fel a marha növekedési hormon gén egy részét meghatározó szekvenciát hordozó két dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst forrásként. A plazmid a pBR322 PstI (5'-CTGCAG-3') restrikciós helyébe építve tartalmazza a 831 bázis-

párból álló és a marha növekedési hormont meghatározó szekvenciát. Miller és munkatársai módszere helyett előállíthatjuk a marha növekedési hormon szekvenciáját a marha agyalapi mirigyből ismert módon izolált mRNS-ből is [Goodman és munkatársai, Methods in Enzymology, 68, 75-90 (1979)].

Ahogy az előzőekben már említettük, a humán növekedési hormon és marha növekedési hormon kódoló szekvenciája igen hasonló, és sok homológiát mutat.

A PvuII (5-CAGCTG-3') restrikciós enzimmel kapott fragmensek felhasználhatók a marha növekedési hormont kifejező plazmid előállítására.

Molekulánként 3 PvuII helyet tartalmazó pNM702 (11. ábra 123.) dezoxi-ribonukleinsav 10 µg-nyi mennyiségét egy egység PvuII enzimmel hasítunk, 200 µl alábbi összetételű PvuII restrikciós pufferban, 10 percen át, 37 °C hőmérsékleten:

60 mmól nátrium-klorid,
6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,5,
6 mmól magnézium-klorid, és
6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

A reakció leállítására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk, és a dezoxi-ribonukleinsavat alkalikus foszfatázzal kezeljük. A részleges emésztés során a PvuII jelenlévő helyeinek fele-kétharmada hasad. A fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen szeparáljuk, és a 11. ábra 125. számmal jelzett helyén megadott dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst (valamivel gyorsabban mozdul el, mint az egy hasítást szenvedett plazmid) kihasítjuk a gélből. Ez a fragmens 497 bázispárból álló PvuII fragmenst nem tartalmazó lineáris plazmidnak felel meg. A tisztított terméket vektorként használjuk a 11. ábra 126. helyén megadott köztes plazmid előállítására.

A pBP348 plazmidból előállítunk egy 494 bázispárból álló PvuII fragmenst. 10 µg plazmidot 200 µl PvuII pufferban emésztünk 10 egység PvuII enzimmel, 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten. A fragmenseket 6% poliakrilamidot tartalmazó gélen szeparáljuk, és a 494 bázispárból álló fragmenst (11. ábra 124.) megfigyeljük, és az előzőekben megadottak szerint tisztítjuk.

Ezután előállítjuk a 11. ábra 126. helyén megadott köztes plazmidot oly módon, hogy 0,2 µg vektort és 0,05 µg, 494 bázispárból álló fragmenst összekapcsolunk 20 µg T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz pufferban, amelyhez 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz adunk. A reakciót 16 órán át végezzük 4 °C hőmérsékleten. Transzformációt és a transzformánsok ampicillin rezisztenciára való szelektálását követően plazmidokat izolálunk az előzőekben megadott Birnboim-módszerrel, és megvizsgáljuk a 494 bázispárból álló PvuII fragmens jelenlétét. A fragmens megfelelő orientációját XbaI és SmaI enzimekkel való egymást követő emésztéssel bizonyítjuk. A

marha növekedési hormon szekvenciából eredő 494 bázispárból álló PvuII fragmens egyetlen asszimetrikus SmaI restrikciós helyet tartalmaz. A kiindulási pNM702 szülő-plazmid SmaI helyet nem tartalmaz. A 494 bázispárból álló PvuII fragmenst és 440 bázispárból álló XbaI, SmaI fragmenst tartalmazó plazmidot köztes plazmidként izoláljuk, és felhasználjuk a további kísérletekben.

A 12. ábra 126. helyén megadott köztes plazmidot átalakítjuk a fuzionált marha növekedési hormont kifejező plasmiddá. Két módon végezzük a kísérletet:

- 1) Az enterokináz szubsztrát-humán növekedési hormon első 30 aminosavát meghatározó kódoló szekvenciát eltávolítjuk, és helyettesítjük az enterokináz szubsztrát-marha növekedési hormon első 31 aminosavát meghatározó szekvenciával, és
- 2) A stop kodonig terjedő kódoló szekvenciában lévő második PvuII hely egy rövid szekvenciáját (ez humán növekedési hormon szekvencia) egy szintetikus fragmenssel helyettesítjük, annak érdekében, hogy helyreállítsuk a marha növekedési hormon 190. aminosavának, az alaninnak a kodonját.

10 µg 12. ábra 126. helyén megadott köztes plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 1 egység PvuII enzimmel hasítunk 200 µl PvuII pufferban. A reakciót 5 percen át végezzük, 37 °C hőmérsékleten. A reakció leállítására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten

tartjuk. A fragmensek keverékét tartalmazó elegyet 1% agarózt tartalmazó gélen szeparáljuk, és a molekulánként csak egy PvuII hasítási helyet tartalmazó lineáris plazmidot izoláljuk és tisztítjuk. A 3 µg terméket 5 egység XbaI enzimmel teljesen emésztjük és alkalikus foszfátazzal kezeljük. A fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen frakcionáljuk, és a legnagyobb fragmenst (ez nem tartalmazza az XbaI és az első PvuII hely között a humán és marha növekedési hormon szekvenciában lévő 109 bázispárból álló részt) izoláljuk, és felhasználjuk klónozó vektorként (12. ábra, 127.).

A marha növekedési hormon első 23 aminosavát meghatározó, 69 bázispárból álló dezoxi-ribonukleinsav-szekvencia az első PvuII helyig két HpaII restrikciós enzimmel hasítható helyet (5'-CCGG-3') tartalmaz. Az első hely 23 bázispárnyi távolságra van a kódoló szekvencia első nukleotidjától. Foszfotriészter-módszerrel 63 bázispárból álló fragmenst szintetizálunk (12. ábra, 128.). Ez a fragmens megfelel az lpp riboszóma kötőhelyében lévő XbaI hely ATG iniciációs kodonig terjedő, 19 bázispárból álló szekvenciának, amit a Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 24 bázispárból álló kódoló szekvencia és 20 olyan nukleotid követ, amely a marha növekedési hormon szekvenciájával azonos a Phe helytől az első HpaII helyig terjedően.

A fragmens az alábbi szerkezetű:

XbaI

```

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGTTCCCATTTGGATGATGATGATAAG-
3'-TCCCATAATTATTACAAGGGTAACCTACTACTACTATTC-
                                     HpaII
TTCCAGCCATGTCCTTGTC      3'
AAGGGTCGGTACAGGAACAGGC  5'

```

A 63 bázispárból álló fragmens előállítására az alábbi szegmenseket állítjuk elő:

- 1) CTAGAGGGTAT
- 2) TAATAATGTTCC
- 3) CATTGGATGAT
- 4) GATGATAAGTTCC
- 5) CAGCCATGTCCTTGTC
- 6) ATGGGAACATTATTAATACCCT
- 7) TTATCATCATCATCCA
- 8) ATGGCTGGGAAC
- 9) CGGACAAGGAC.

A fenti szegmenseket felhasználva T4 ligázal katalizált reakciókat végzünk, az alábbi sorrendben:

- a) Az 1. 5'-nem-foszforilezett szegmenst 5'-foszforilezett 6. szegmens jelenlétében hozzákapcsoljuk az 5'-foszforilezett 2. szegmenssel T4 ligáz katalizálta reakcióban, amiután megkapjuk az 1. duplexet. Ezt 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk.

b) A 3., 4. és 5. 5'-foszforilezett szegmenseket 5'-foszforilezett 7. és 8., továbbá 5'-nem-foszforilezett 9. szegmens jelenlétében T4 ligázal kapcsoljuk, amiután megkapjuk a 2. dezoxi-ribonukleinsav-duplexeket. Ezt 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk.

c) Az 1. és 2. duplexeket T4 ligázal összekapcsoljuk, amiután megkapjuk a 12. ábra 128. dezoxi-ribonukleinsav-duplexét, ezt 15% poliakril-amidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk. A dezoxi-ribonukleinsav-duplexet T4 polinukleotid-kinázzal és (gamma-p³²)ATP-vel ismert módon enzimatikusan foszforilezzük.

A fentiekben megadott HpaII helytől a PvuII helyig terjedő, 46 bázispárból álló dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst az eredeti pBP348 plazmidból állítjuk elő. 100 µg plazmidot 400 µl PvuII pufferban 50 egység PvuII enzimmel kezelünk, 2 órán át, 37 °C hőmérsékleten. Fenolos extrakciót és etanolos kicsapást követően a dezoxi-ribonukleinsavat

400 µl PstI (5'-CTGCAG-3') alábbi összetételű pufferban oldjuk:

- 50 mmól nátrium-klorid,
- 6 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
- 6 mmól magnézium-klorid, és
- 6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

Az emésztést 50 egység PstI enzimmal végezzük, 2 órán át, 37 °C hőmérsékleten. A dezoxi-ribonukleinsav-fragmenseket 6% poli-akril-amidot tartalmazó, 30 cm hosszú gélen frakcionáljuk, és a szükséges, 46 bázispárból álló szekvenciát tartalmazó, 135 bázispárból álló fragmenst izoláljuk és ismert módon tisztítjuk. A kapott dezoxi-ribonukleinsav harmadát (33 µg plazmiddal ekvivalens mennyiség) HpaII restrikciós enzimmal részlegesen emésztjük. A dezoxi-ribonukleinsavat 100 µl alábbi összetételű HpaII pufferban oldjuk:

- 20 mmól trisz-hidrogén-klorid, pH = 7,4,
- 7 mmól magnézium-klorid, és
- 6 mmól β-merkaptó-etanol, literenként.

A reakciót 1 egység HpaII enzimmal végezzük, 40 percen át, 37 °C hőmérsékleten. A reakció leállítására az elegyet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten tartjuk. A dezoxi-ribonukleinsav-fragmenseket 5% akril-amidot tartalmazó gélen frakcionáljuk. Egy külön csikon SauIIA restrikciós enzimmal emésztett, 1 µg pBR322 dezoxi-ribonukleinsavat futtatunk. A fragmensek keveréke tartalmaz egy 46 bázispárból álló fragmenst, ezt markerként használjuk. A 135 bázispárból álló fragmens HpaII enzimmal való részleges emésztését követően kapott, 46 bázispárból álló fragmenst (12. ábra 124.) ismert módon tisztítjuk.

0,2 µg, XbaI és PvuII végekkel rendelkező plazmid vektort (12. ábra 127.) 3,2 pikomól, 66 bázispárból álló szintetikus fragmenssel (12. ábra, 128.) és 0,5-1 pikomól, 46 bázispárból álló fragmenssel (12. ábra, 124.) keverünk 10 µl ligációs pufferban. A fragmensek kötését 2 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázzal végezzük, 16 órán át, 4 °C hőmérsékleten. Az eleggyel E. coli JA221 sejteket transzformálunk, és az ampicillin rezisztens telepekből plazmidokat izolálunk. A plazmidokat megvizsgáljuk a 494 bázispárból álló PvuII és a 109 bázispárból álló XbaI, PvuII fragmens jelenlétére. A 12 vizsgált telep egyike tartalmazza ezen fragmenseket. A plazmidot az XbaI helytől a PvuII helyig szekvenciáljuk, és marha növekedési hormonnal szemben radioimmun-méréssel vizsgáljuk. Úgy találtuk, hogy pozitívan reagál a radioimmun-mérés során, és adott szekvenciával rendelkezik. A plazmidot pNM789 jellel jelöljük, és a 12. ábra 129. jellel jelölt részén adjuk meg. Standard radioimmun-méréssel megvizsgáljuk a marha növekedési hormon kvantitatív kifejeződését, és úgy találtuk, hogy sejtenként legalább 10⁵ molekula van jelen.

A 13. ábra 129. helyén megadott pNM789 plazmid a marha növekedési hormon teljes kódolására 1 aminosavat meghatározó kodon cseréjét igényli. Ezt úgy végezzük el, hogy a pNM789 28 bázispárból álló PvuII-BamHI fragmensét az alábbi szekvenciájú, és a 13. ábra 130. helyén bemutatott szerkezetű, szintetikus kétszálú fragmenssel helyettesítjük (a fragmens a felső szálon 13, az alsó szálon 17 bázispárt tartalmaz):

5'-CTGTGCCTTCTAG-3'
3'-GACACGGAAGATCCTAG-5'.

10 µg NM789 plazmidot 1 egység PvuII enzimmal kezelünk, 200 µl PvuII pufferban, 5 percen át, 37 °C hőmérsékleten. Az enzimet 10 percen át 65 °C hőmérsékleten inaktíváljuk. A mintát 300 µl-re hígítjuk BamHI puffer adagolásával, és 10 egység BamHI enzimmal teljesen emésztjük. Az emésztést 1 órán át végezzük 37 °C hőmérsékleten. Ezután 5 egység alkalikus foszfatázt adunk, és 1 órán át 65 °C hőmérsékleten folytatjuk a z inkubációt. A dezoxi-ribonukleinsav-fragmenseket 1% agarózt tartalmazó gélen szeparáljuk, és a 13. ábra 131. számmal jelzett helyén megadott dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst tisztítjuk. Ez a plazmid egy helyen való hasításkor keletkezik. 0,2 µg tisztított terméket 5 pikomól szintetikus fragmenssel ligálunk 2 egység T4 ligázzal, 20 µl ligáz-pufferral készült reakcióelegyben, 1 éjszakán át, 4 °C hőmérsékleten. Transzformációt és az előzőekben ismertetett Birnboim plazmid izolálását követően több olyan plazmidot szelektálunk, amelyek tartalmazzák a megfelelő PvuII fragmenst (494 bázispár) és XbaI, BamHI fragmenst (628 bázispár). Ezek közül legalább kettőnek a szekvenciáját meghatározzuk a BamHI helytől az egyetlen SmaI helyig, majd az adott szekvenciával rendelkező, és a 13. ábra 132. helyén bemutatott egyik plazmidot kiválasztjuk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán vagy bovin növekedési hormon kifejezésére használható rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor előállítására, azzal jellemezve, hogy összekapcsolunk

- a) funkcionális replikációs origót tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst;
- b) egy vagy több dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst, amelyek mindegyike megfelelő gazdasejtbe transzformálva az adott vektort, a transzformálható gazdasejtnél szelekcióra alkalmas tulajdonságot biztosít; és
- c) egy olyan dezoxi-ribonukleinsav-szegmenst, amely tandem elhelyezkedésében az alábbi szekvenciákat hordozza:
 - 1) egy E. coli lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia promotere,

- 2) egy *E. coli* lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 5'-nem-transzlatált régiója, és
- 3) egy transzlációs start kodon, amelyet egy
- A) humán vagy bovin növekedési hormon meghatározó szekvencia, vagy
- B) egy enterokináz hasítási helyet meghatározó nukleotid-szekvencia, amelyhez közbenső kodonok nélkül egy humán vagy bovin növekedési hormont meghatározó nukleotid-szekvencia kapcsolódik, követ és kívánt esetben
- d) egy *E. coli* lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia 3'-nem-transzlatált szakaszának egészét vagy egy részét, ahol a nem-transzlatált szakasz jobbra haladva humán vagy bovin növekedési hormont leíró szekvenciához kapcsolódik, és kívánt esetben
- e) egy *E. coli* lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia transzkripciósi terminációs régiójának egészét vagy egy részét, ahol a transzkripciósi terminációs régió jobbra haladva kapcsolódik az idegen proteint kódoló szekvenciához, és kívánt esetben
- f) egy *E. coli* lipoprotein kifejeződést szabályozó szekvencia transzkripciósi terminációs régiójának egészét vagy egy részét, ahol a transzkripciósi terminációs szakasz jobbra haladva kapcsolódik az adott 3'-nem-transzlatált régióhoz.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy enterokinázzal hasítható helyként Asp-Asp-Asp-Asp-Lys aminosav-szekvenciát meghatározó kodonokat tartalmazó szekvenciát alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy enterokináz hasítási helyet kódoló dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciaként az alábbival azonos szekvenciát alkalmazunk:

GATGATGATGATAAG
CTACTACTACTATTC.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az enterokináz hasítási helyként Phe-Pro-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys aminosav szekvenciát kódoló szekvenciát alkalmazunk.

5. Az 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy enterokináz hasítási helyet dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciaként az alábbi kodonokat tartalmazó szekvenciát alkalmazunk:

TTCCCATTTGGATGATGATGATAAG
AAGGTAACCTACTACTACTATTC.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás humán növekedési hormont kifejező plazmid előállítására, azzal jellemezve, hogy
- a) a pNM645 plazmid előállítására a pNM575 plazmid 691 bázispárból álló BamHI fragmensének 538 bázispárból álló FnuDII fragmensét, a pKEN021 plazmid alkalikus foszfatázzal kezelt BamHI-XbaI fragmensét és a humán növekedési hormont meghatározó régióhoz kapcsolt, az lpp promotor régiót tartalmazó szintetikus kétszálú dezoxiribonukleinsav-fragmenst összekapcsoljuk, vagy
- b) a pNM736 plazmid előállítására a pBR322 617 bázispárból álló HindIII-SalI fragmensét hozzákapszoljuk a pNM645 plazmid tompa végű BamHI fragmenséből SalI emésztéssel kapott legnagyobb fragmenséhez, vagy
- c) a pNM702 plazmid előállítására összekapcsoljuk a pNM575 plazmid 691 bázispárból álló BamHI fragmenséből FnuDII emésztéssel kapott, 538 bázispárból álló fragmensét, a pKEN21 plazmid alkalikus foszfatázzal kezelt BamHI-XbaI fragmensét, és tandem elhelyezkedésben az lpp promotor régiót, a start kodont, enterokináz által felismerhető és hasítható rövid peptidet meghatározó kodonokat tartalmazó régiót, és humán növekedési hormont meghatározó szekvenciát tartalmazó szintetikus kétszálú dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst.

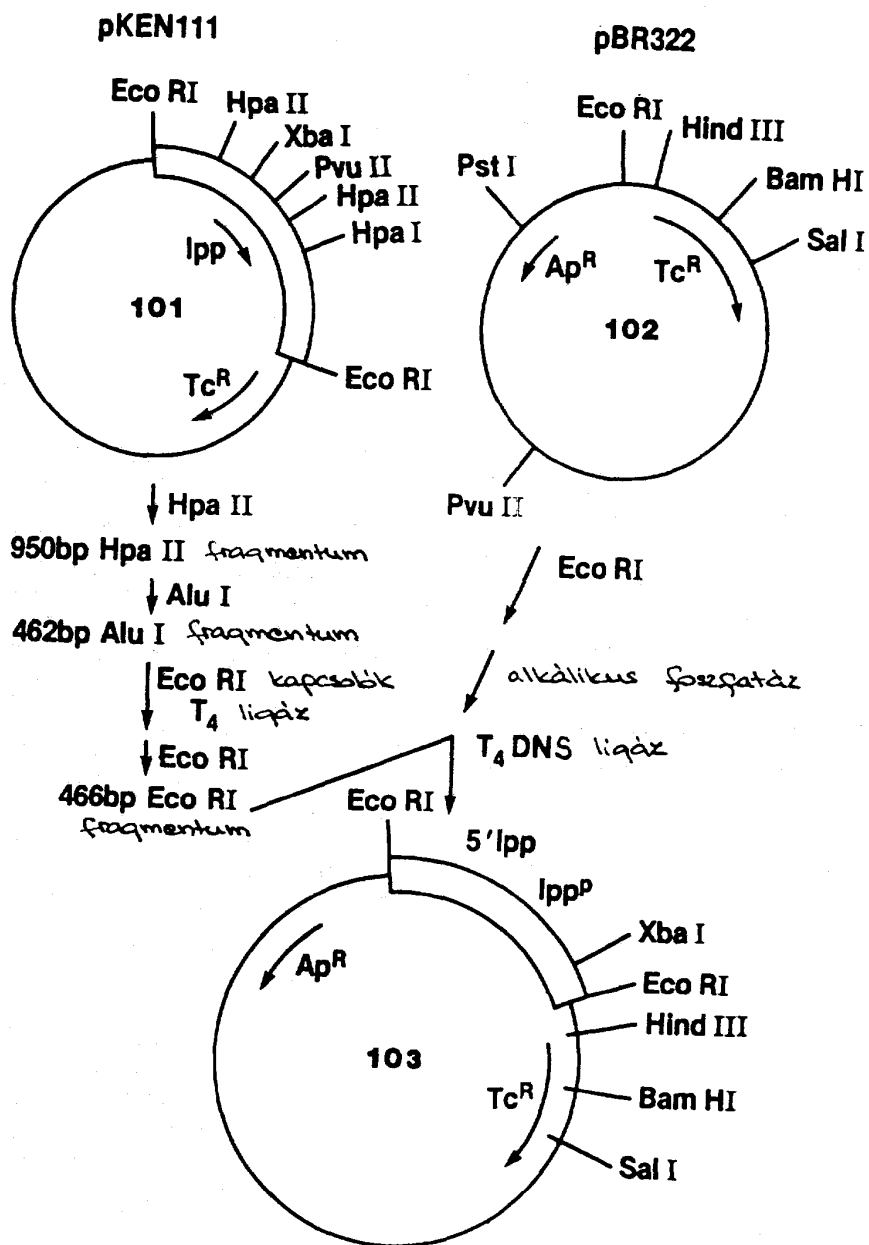
7. Az 1. igénypont szerinti eljárás bovin növekedési hormont kifejező plazmid előállítására, azzal jellemezve, hogy
- a) a pKEN797 plazmid előállítására a pNM685 plazmid részleges PvuII emésztésével kapott fragmenséből kapott legnagyobb fragmenst, egy 42 bázispárból álló szintetikus dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst, és pBP348 plazmid 135 bázispárból álló PvuII fragmenséből HpaII emésztéssel kapott 46 bázispárból álló fragmenst összekapcsoljuk, vagy
- b) a pNM789 plazmid előállítására összekapcsoljuk a pBP348 PvuII emésztéséből kapott 494 kb-s fragmentumából és a pNM702 plazmid részleges emésztéséből kapott fragmentum ligálásával kialakított intermedier plazmid legnagyobb, alkalikus foszfatázzal kezelt részleges PvuII-XbaI emésztéssel kapott fragmensét, egy 63 bázispárból álló szintetikus dezoxiribonukleinsav-fragmenst, és pBP348 plazmid PvuII emésztéssel kapott, 135 bázispárból álló fragmenséből részleges HpaII emésztéssel nyert, 46 bázispárból álló fragmensét.

13 rajz

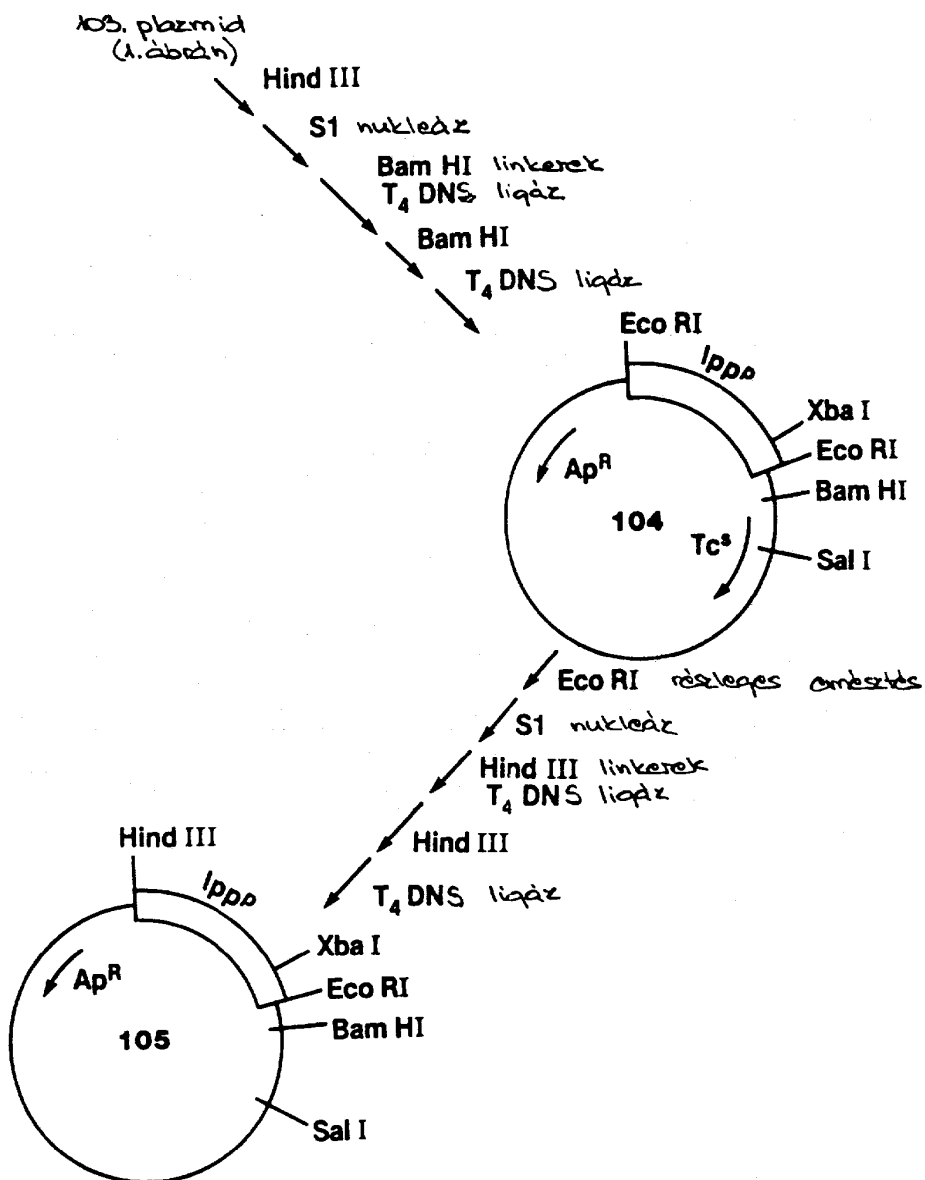
A kiadásért felel a Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó igazgatója

90.2043.66-4 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató

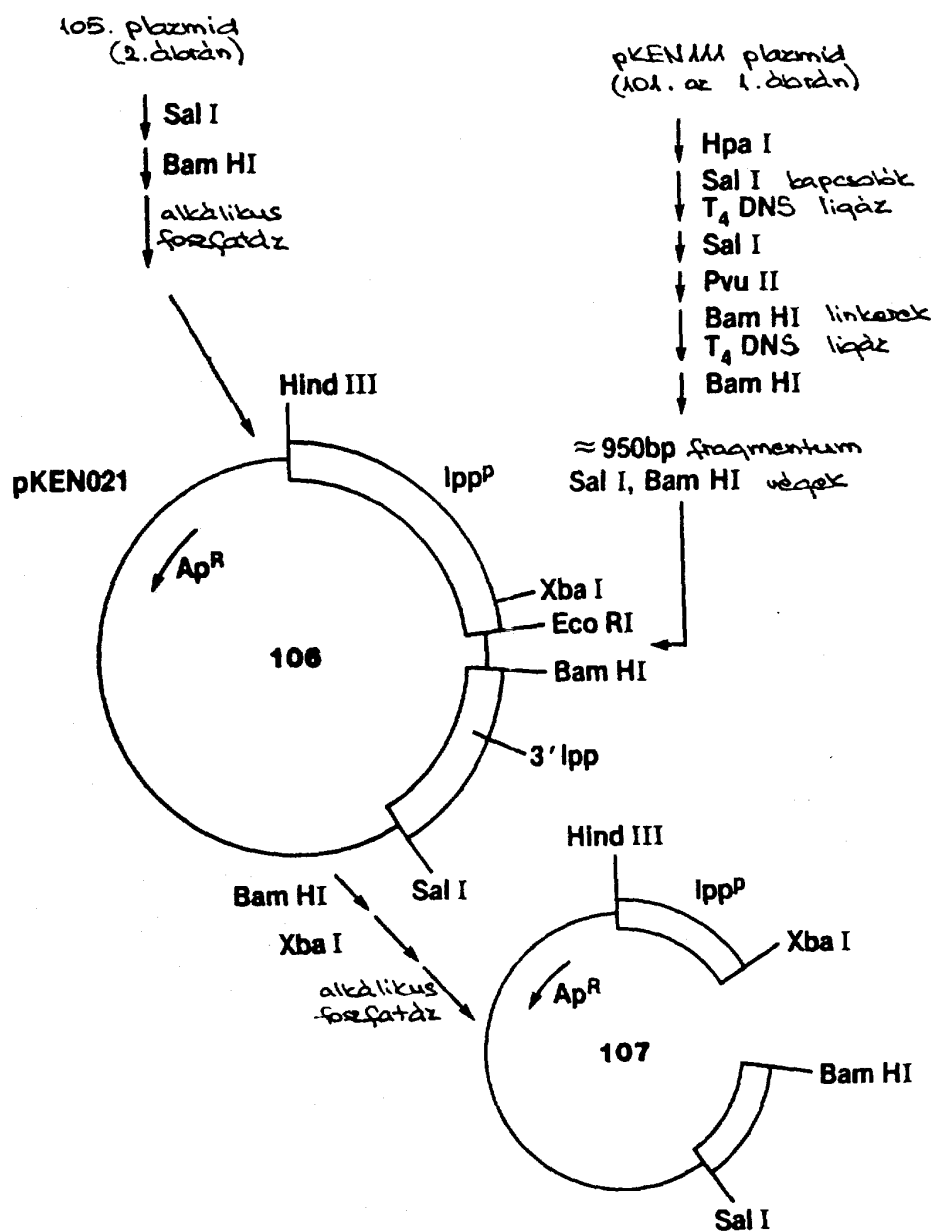
λ.dbra



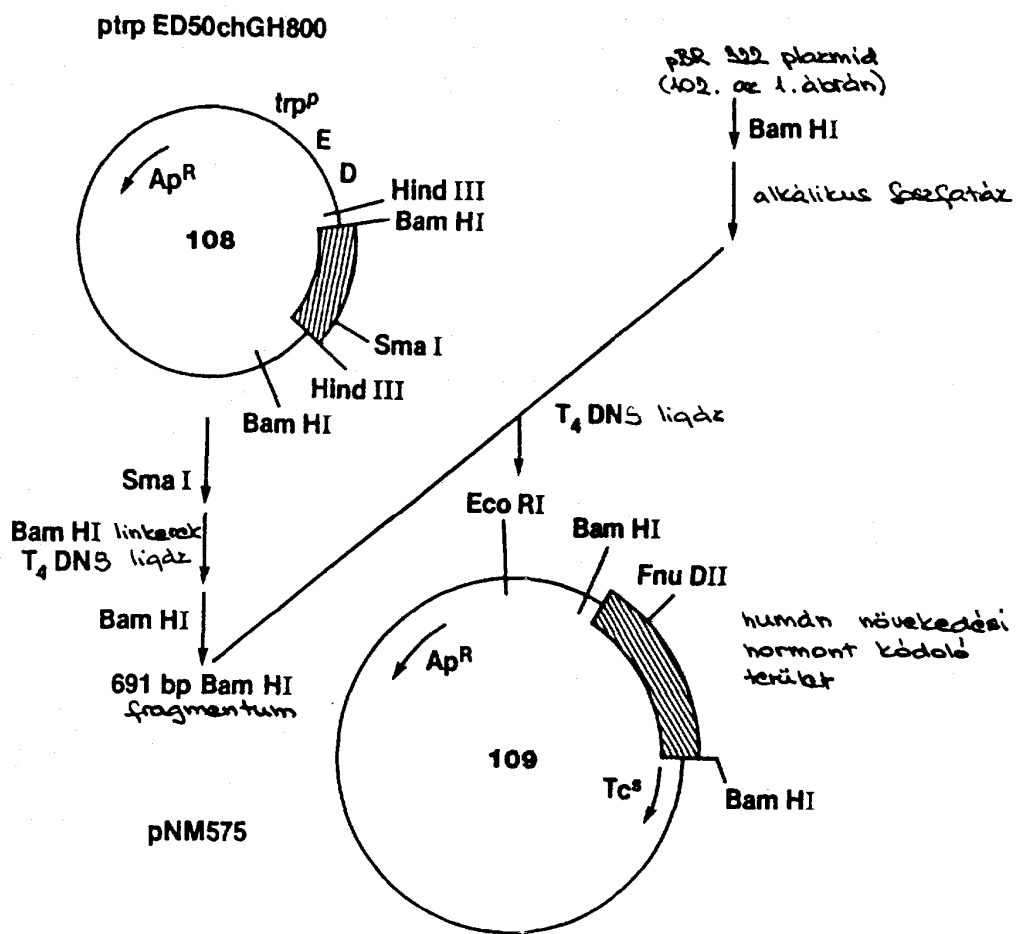
2. ábra



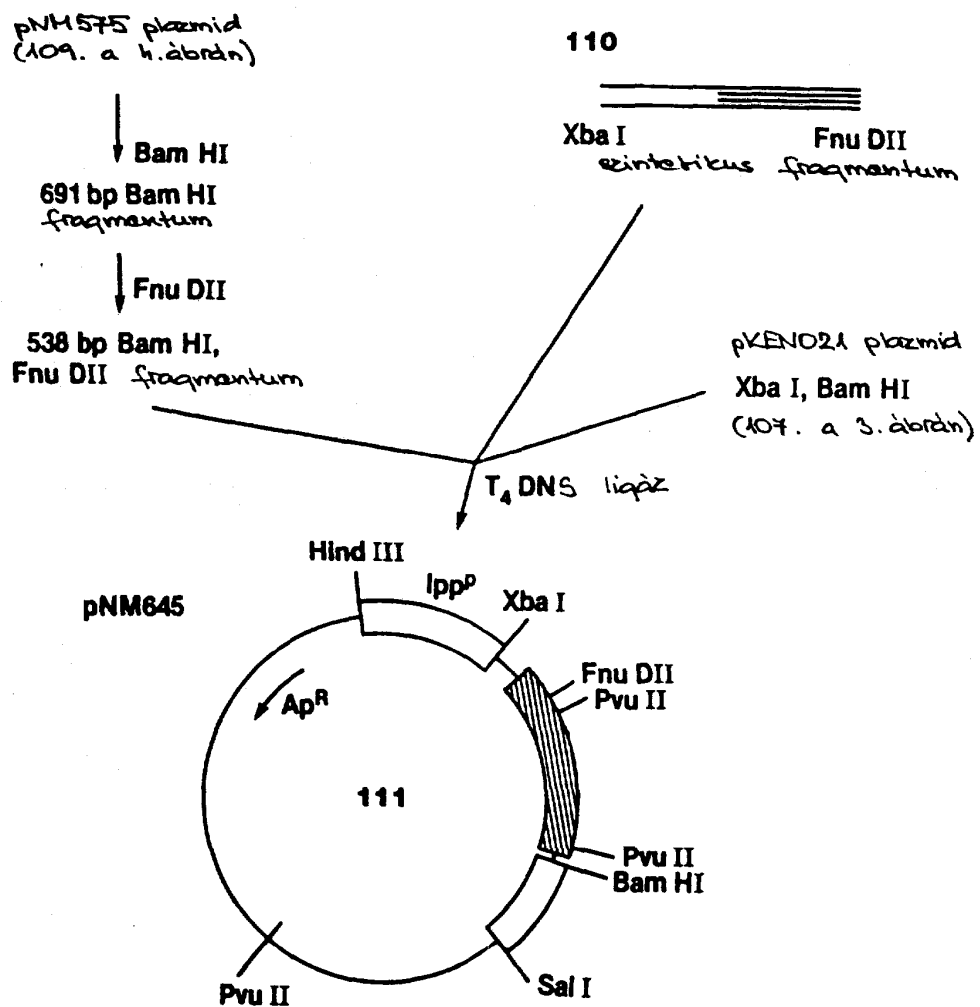
3. ábra



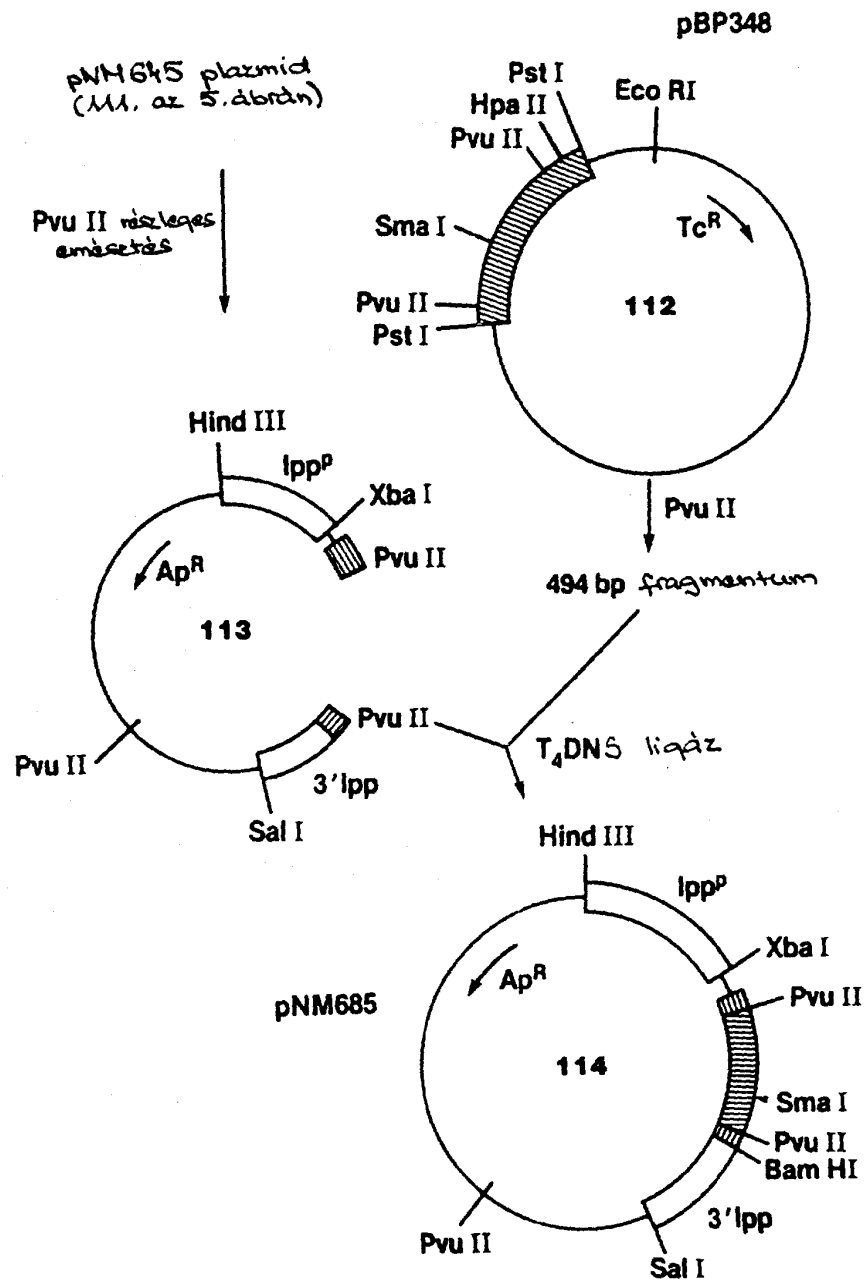
4. ábra



5. ábra

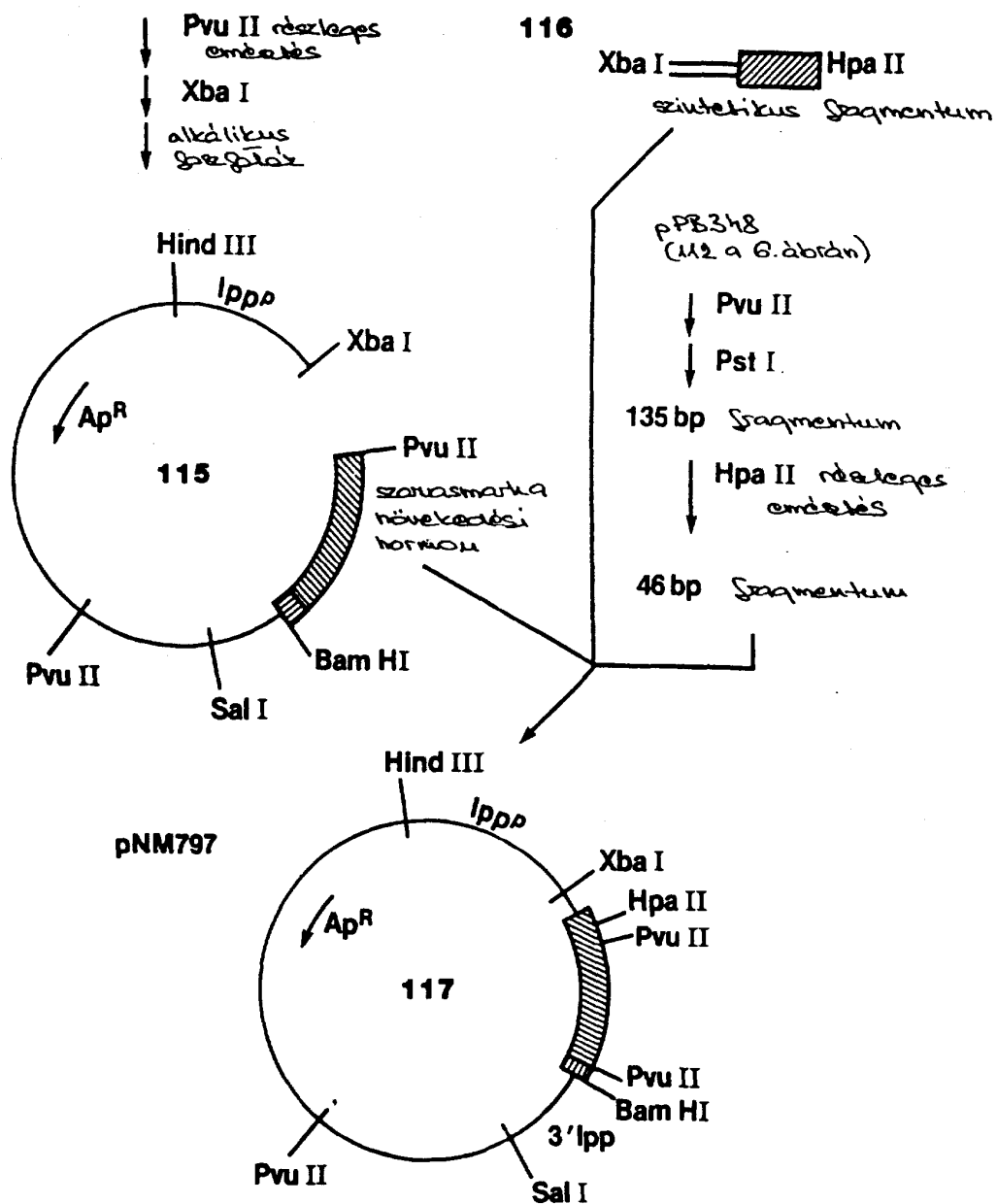


6. ábra



7. ábra

114. (a 6. ábrán)

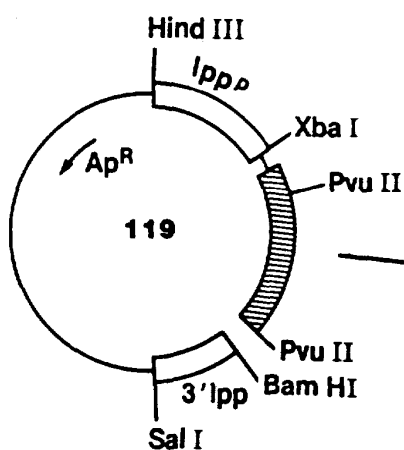


8. ábra

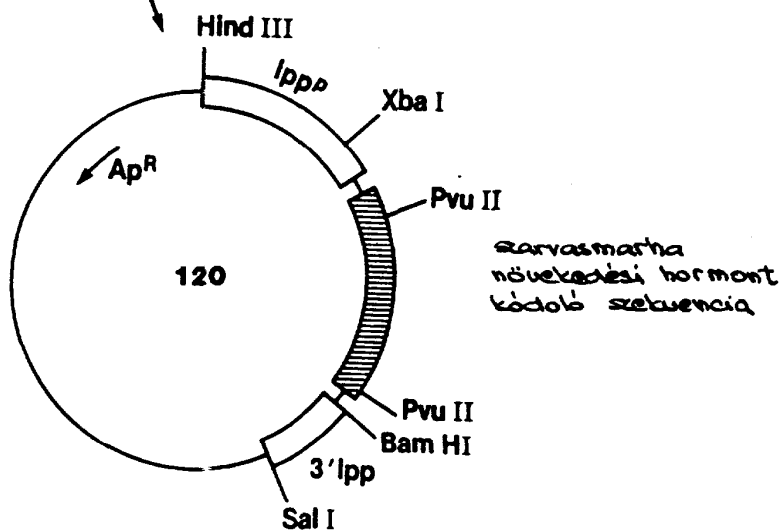
PNH797 plazmid
(117 a 7. ábrán)

↓ Pvu II részleges
emésztés
↓ Bam HI
↓ alkalikus foszfatáz

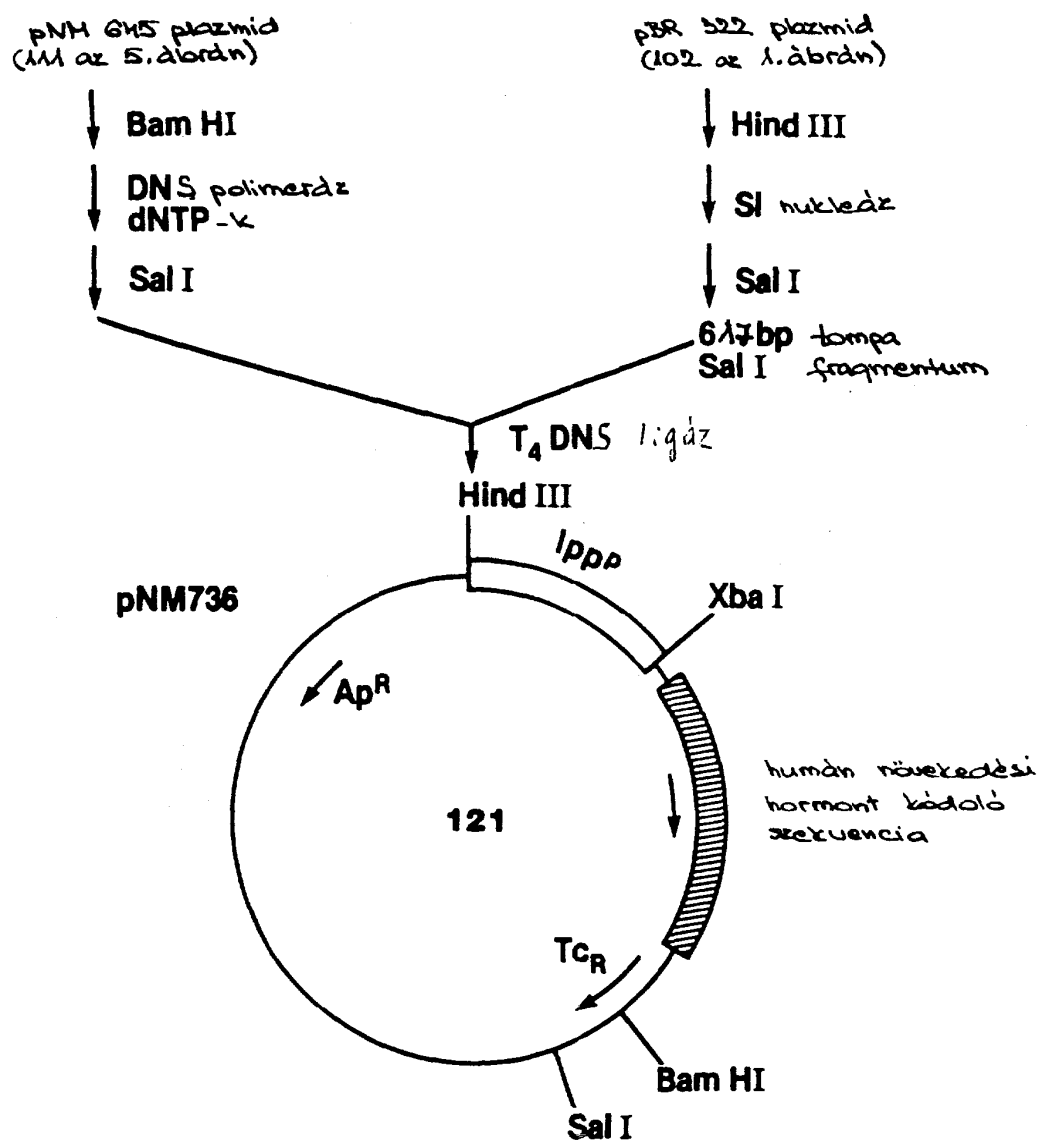
118 
Pvu II Bam HI
szintetikus fragmentum



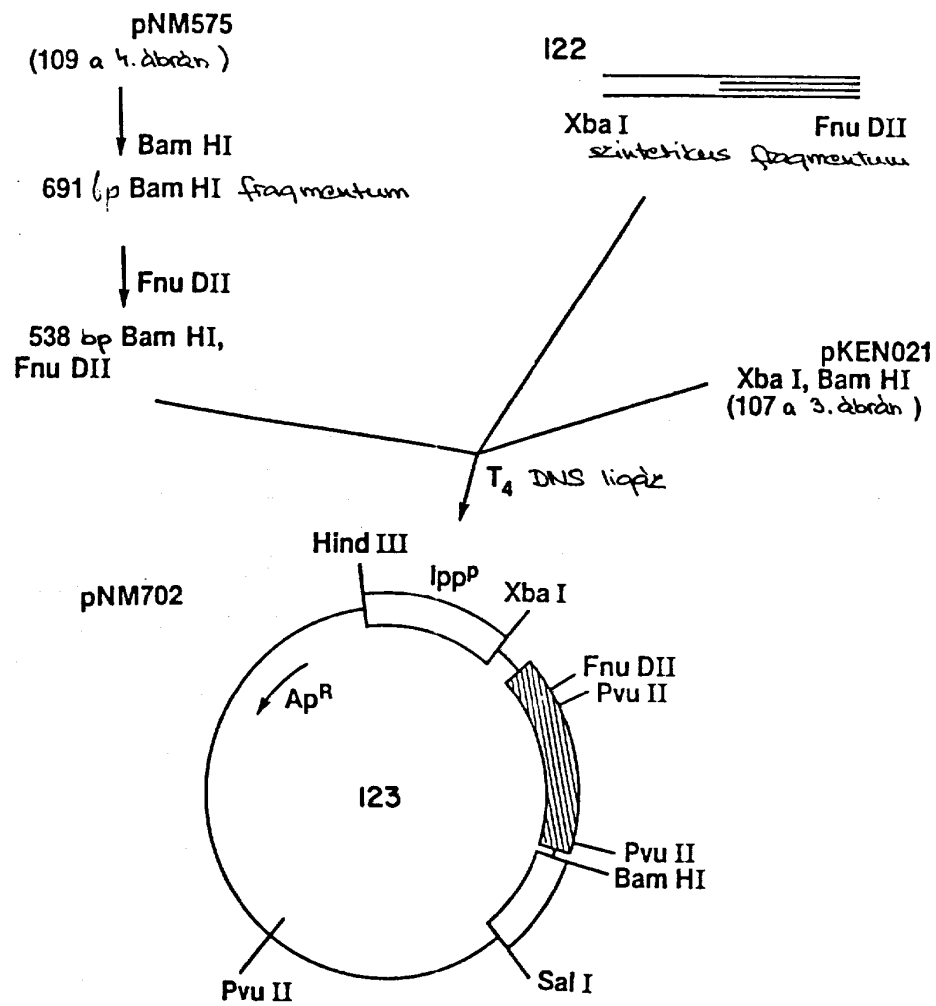
T₄ DNS ligáz



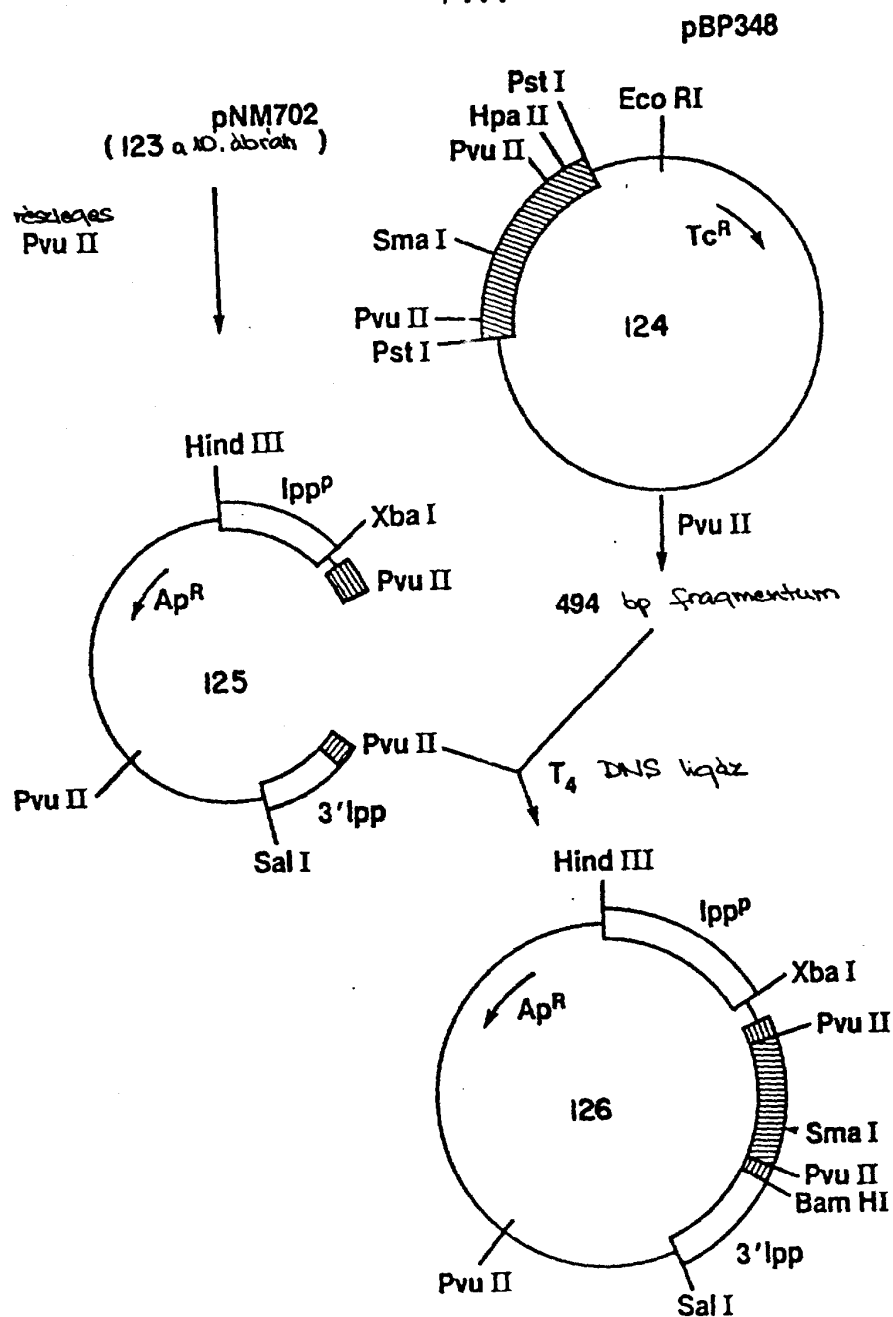
9. ábra



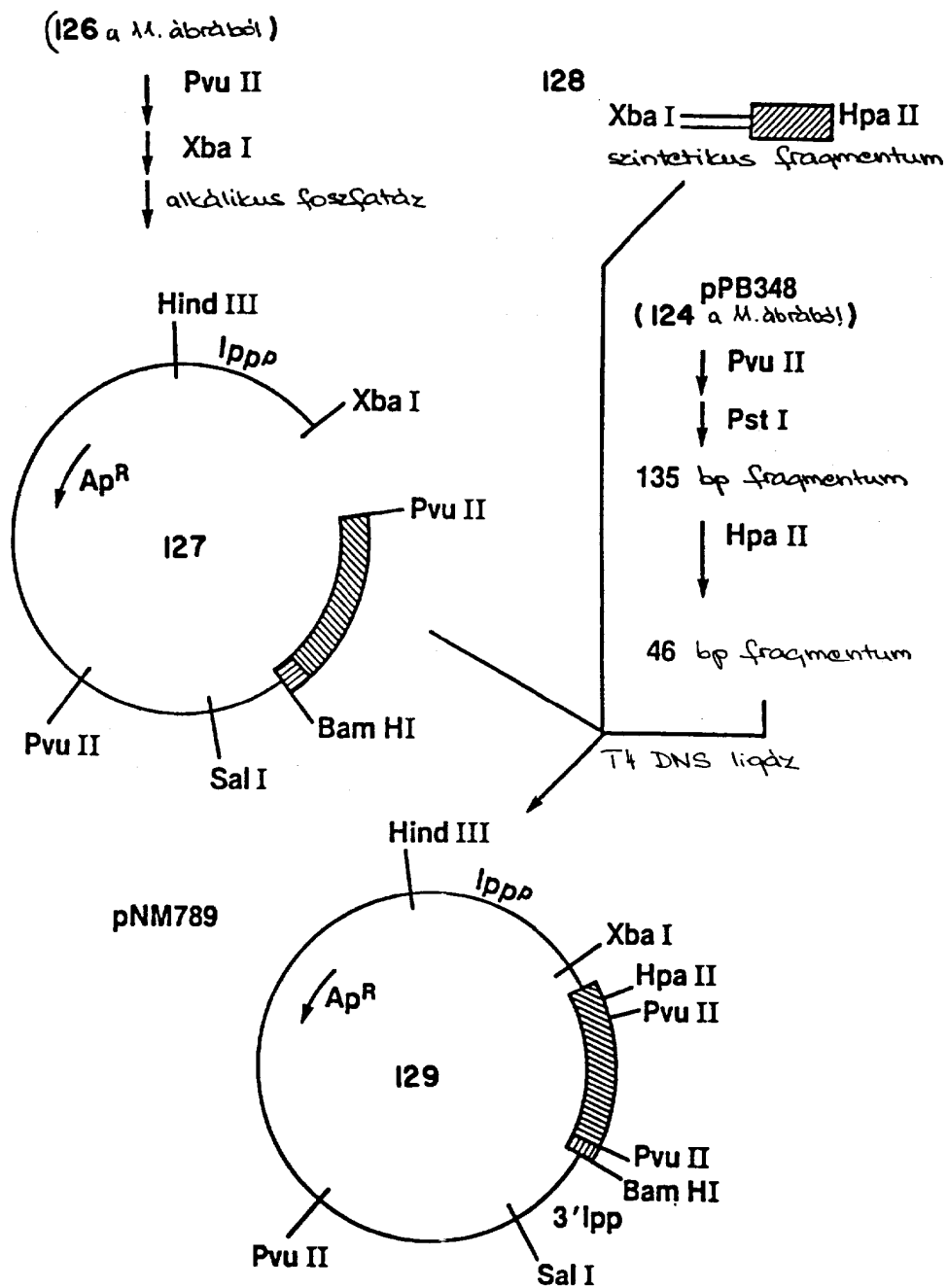
10. ábra



II. ábra



12. ábra



13. ábra

