



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 03656

(22) A bejelentés napja: 1995. 12. 19.

(30) Elsőbbségi adatok:

08/363,475 1994. 12. 23. US

(40) A közzététel napja: 1997. 02. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2000. 06. 28.

(11) Lajstromszám:

**218 265 B**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 12 N 15/55**

C 12 N 15/80

C 12 P 21/00

(72) Feltalálók:

jr. Burnett, William V., Fayetteville,  
New York (US)

Chiang, Shu-Jen, Manlius, New York (US)

Tonzi, Sean M., Skaneateles, New York (US)

(73) Szabadalmas:

Bristol-Myers Squibb Company, New York, New  
York (US)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi  
Iroda, Budapest

**(54) V-penicillin amidohidrolázt kódoló izolált nukleinsavszekvenciák *Fusarium oxysporum*-ból, ezeket tartalmazó expressziós vektorok és gazdasejtek, és eljárás az általuk kódolt polipeptidok előállítására**

### **KIVONAT**

A találmány tárgyát *Fusarium oxysporum*-ból származó, V-penicillin amidohidroláz (PVA) enzimet kódoló nukleinsavszekvenciák, a *Fusarium oxysporum* 435 törzsből származó új promoter, a teljes PVA-gént vagy annak egy részét és/vagy az új promotert tartalmazó expressziós vektorok, az expressziós vektorokat tartalmazó gazdasejtek és ezek felhasználásával PVA-

aktivitású polipeptidok előállítására szolgáló eljárás képezik.

A PVA-aktivitással rendelkező polipeptid előállítását transzformált *Escherichia coli* gazdasejtekben valósítják meg, a rekombináns gén kifejeződését elősegítő fenoxi-acetát-prekuzornak a tápoldatba történő adagolásával.

A találmány tárgyát képezi egy izolált nukleinsav-molekula, amely a *Fusarium oxysporum* 435 törzsből származó teljes PVA-t vagy annak egy részét kódolja, továbbá a PVA-gén klónozása, szekvenálása és kifejezése.

Egy másik vonatkozásban a találmány tárgyát a *Fusarium oxysporum* 435 törzsből származó új promotor, a teljes PVA-gént vagy annak egy részét és/vagy az új promotert tartalmazó expressziós vektorok és az expressziós vektorokat tartalmazó gazdasejtek is képezik. Még további vonatkozásban a találmány tárgyát PVA – különösen fenoxi-acetát-prekurzor jelenlétében történő – előállítását képezi.

A V-penicillin amidohidroláz enzimet a V-penicillin (fenoxi-metil-penicillin) 6-amino-penicillánsavvá (6-APA-vá) történő enzimikus hidrolízisére használják. A 6-APA a felszintetikus penicillinek előállításában felhasznált aktív  $\beta$ -laktámmag. Különböző V-penicillin amidohidroláz (penicillin V amidohidrolase=PVA) enzimeket találtak gomba-, *Streptomyces*- (fonalas baktérium) és baktériumforrásokban [Lowe et al., *Biotechnol. Lett.* 8, 151–156 (1986)]. A *Fusarium oxysporum* törzsből származó PVA-enzim-aktivitást írta le Lowe és munkatársai, az enzimet azonban nem izolálták vagy tisztították.

#### Az ábrák magyarázata

1. ábra: Az érintetlen PVA-enzim hat peptidfragmentumának aminosavszekvenciái. Az N-terminális vég aminosavszekvenciája az 1. számú szekvencia; az A peptid aminosavszekvenciája a 2. számú szekvencia; a B1 peptid aminosavszekvenciája a 3. számú szekvencia; a B2 peptid aminosavszekvenciája a 4. számú szekvencia; a C peptid aminosavszekvenciája az 5. számú szekvencia; a D peptid aminosavszekvenciája a 6. számú szekvencia; az E peptid aminosavszekvenciája a 7. számú szekvencia.

2. ábra: Oligonukleotidpróba. Négy oligonukleotidpróbából álló készletet származtattunk a C peptidről (5. számú szekvencia) hét aminosav reverz transzkripciójával. A hét aminosavból álló szekvencia a 8. számú szekvencia; a 8. számú szekvenciából reverz transzkripcióval kapott DNS-szekvencia a 9. számú szekvencia; a 9. számú szekvenciával komplementer DNS-szekvencia a 10. számú szekvencia; az oligonukleotidpróba a 11. számú szekvencia.

3. ábra: Különböző DNS- és peptidfragmentumok. A PVA N-terminális aminosavszekvenciája a 12. számú szekvencia; a 2585 translált aminosavszekvencia a 13. számú szekvencia; a 2585 DNS-szekvencia a 14. számú szekvencia; a 2585–M DNS-szekvencia a 15. számú szekvencia; a 2585–FL translált aminosavszekvencia azonos a 12. számú szekvenciával; a kódolószál 2585–FL DNS-szekvenciája a 16. számú szekvencia; a templátszál 2585–FL DNS-szekvenciája (azaz a kódolószál komplementere) a 17. számú szekvencia. Minden nukleotidszekvenciát (a 17. számú szekvencia kivételével) balról jobbra, az 5'-től 3'-irányba mutatunk be.

4. ábra: A 2585–FL vázlatos bemutatása.

5. ábra: A genomális PVA-gén klónozásának vázlatos bemutatása.

6. ábra: PVA cDNS (18. számú szekvencia) és a megfelelő aminosavszekvencia (19. számú szekvencia). Az aláhúzott DNS-szekvencia (1348–1368. bázispár, 20. számú szekvencia) komplementer egy 20 tagú próbával (11. számú szekvencia). A csillag terminációs kodont jelez.

7. ábra: PVA genomális DNS (21. számú szekvencia) és a megfelelő aminosavszekvencia (22. számú szekvencia). Az 1–240. bázispárok alkotják a promotert (23. számú szekvencia). Az első csillag jelzi a transzkripció startját, és a második csillag jelzi a terminációs kodont.

8. ábra: A pWB19N szerkesztésének vázlatos bemutatása.

9. ábra: A pSJC62 szerkesztésének vázlatos bemutatása.

10. ábra: A pBMFXPVA6 szerkesztésének vázlatos bemutatása.

11. ábra: A pBMFXPVA7 szerkesztésének vázlatos bemutatása.

12. ábra: A pF020 szerkesztésének vázlatos bemutatása.

13. ábra: A pF020–P szerkesztésének vázlatos bemutatása.

14. ábra: A pBMPVA–P szerkesztésének vázlatos bemutatása.

15. ábra: A pF020–M szerkesztésének vázlatos bemutatása.

16. ábra: A pBMPVA–M szerkesztésének vázlatos bemutatása.

17. ábra: A pBMPVA–P/DAA02 szerkesztésének vázlatos bemutatása.

18. ábra: A pBMPVA–M/DAA04 szerkesztésének vázlatos bemutatása.

A találmány tárgyát olyan izolált nukleinsavmolekula képezi, amely tartalmazza a *Fusarium oxysporum*-ból származó PVA egészét vagy annak egy részét kódoló nukleinsavszekvenciát. A nukleinsavmolekula előnyösen DNS-molekula, és a nukleinsavszekvencia DNS-szekvencia. Minden DNS-szekvenciát olyan, formában mutatunk be, amelyben a balról jobbra a megszokott 5'-től 3'-irányba haladunk (egyedüli kivétel a 17. számú szekvencia, ahogyan azt a 3. ábrán bemutatjuk). Továbbá előnyben részesítjük az olyan DNS-szekvenciát, amely lényegében a 6. és 7. ábrán bemutatott nukleotidszekvencia (különösen a 18. és 21. számú szekvencia) egészét vagy egy részét tartalmazza; vagy olyan DNS-szekvenciát, amely ezen DNS-szekvenciák valamelyikének komplementere; vagy olyan DNS-szekvenciát, amely ezen DNS-szekvenciák valamelyikének komplementerével hibridizál. Előnyösen a DNS-szekvencia szigorú körülmények között hibridizál. A „szigorú körülmények” nem kevésbé szigorú körülményeket jelent, mint amelyet az „Előnyben részesített kiviteli alakok részletes példái” fejezetben írunk le. A PVA egy részét kódoló nukleotidszekvencia (például DNS-szekvencia) esetében előnyben részesítjük, hogy a nukleotidszekvencia legalább körülbelül 20 nukleotid hosszúságú legyen.

Előnyben részesített DNS-fragmentumok a 11. számú szekvenciával rendelkező próba és a 23. számú szekvenciával rendelkező promóter.

A találmány szerinti PVA-molekuláknak nem elengedhetetlenül szükséges katalitikusan aktívnak lenniük. Katalitikusan inaktív PVA vagy fragmentumai felhasználhatók például a fehérjével szembeni antitestek termelésére.

Szándékaink szerint a találmány oltalmi körébe tartoznak a módosított szekvenciák is. E bejelentésben a „módosított” kifejezés, amennyiben nukleotid- vagy polipeptidszekvenciára utal, olyan nukleotid- vagy polipeptidszekvenciát jelent, amely különbözik a természetben található vad típusú szekvenciától.

A találmány szerinti DNS-szekvenciák megkaphatók a szakterületen mindennapos gyakorlatként jól ismert különböző módszerek alkalmazásával. Legalább három lehetséges fő módszer alkalmazható:

1) kettős szálú DNS-szekvencia izolálása a genomiális DNS-ből vagy olyan komplementer DNS-ből (cDNS), amely tartalmazza a szekvenciát;

2) a DNS-szekvencia kémiai szintézise; és

3) a DNS-szekvencia szintézise polimeráz-láncreakcióval (PCR=polymerase chain reaction).

Az első megközelítésben genomiális vagy cDNS-könyvtárat screenelhetünk a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvencia azonosítása céljából. Például screenelhetjük a *Fusarium oxysporum* genomiális könyvtárat a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvencia azonosítása céljából. A genomiális DNS- vagy cDNS-könyvtárak screenelésére különböző technikák használhatók.

Például olyan jelzett egyszálú DNS-próbaszekvenciák – amelyek megkettőzik a cél genomiális DNS-ben vagy cDNS-ben jelen levő, a PVA egészét vagy egy részét kódoló szekvenciát – alkalmazhatók a genomiális DNS vagy cDNS egyszálú formává denaturált, klónozott másolatainak elvégzett DNS/DNS hibridizációs eljárásokban.

Genomiális DNS- vagy cDNS-könyvtár screenelhető a PVA egészét vagy egy részét kódoló genomiális DNS-re vagy cDNS-re immunblot technikák felhasználásával.

Egy tipikus screenelési eljárásnál, amely alkalmas vagy immunblot, vagy hibridizációs technikákhoz, a genomiális DNS-könyvtárat – amely általában egy vektorban található – vagy a cDNS-könyvtárat először agarlemezekre szélesztjük, és utána a klónokat szűrőmembránokra visszük át, például nitro-cellulóz-membránokra. A DNS-próbát ezután hibridizálhatjuk, vagy egy antitestet köthetünk a klónokhoz, hogy azonosítsuk azokat a klónokat, amelyek a PVA egészét vagy egy részét kódoló genomiális DNS-t vagy cDNS-t tartalmaznak.

A második megközelítésben a találmány szerinti, a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciákat kémiai szintetizálhatjuk. Például a PVA-t kódoló DNS-szekvenciát szintetizálhatjuk 100 bázisból álló oligonukleotidok sorozataként, amelyeket sorban egymás után ligálhatunk (megfelelő terminális restri-

ciós helyeken vagy komplementer terminális szekvenciákon keresztül) oly módon, hogy a nukleotid helyes lineáris szekvenciáját kapjuk.

A harmadik megközelítésben a találmány szerinti, a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciákat szintetizálhatjuk PCR alkalmazásával. Röviden, a cél-DNS-szekvencia szemben álló szálaival hibridizáló, legalább 15 bázis hosszúságú szintetikus DNS-oligonukleotid-párokat (PCR-primereket) használunk a célszekvencián levő DNS interveniálórégiójának enzim meg sokszorozására. A templát hődenaturációjának ismételt ciklusai, a primerek annealingje (fokozatos lehűtéssel a DNS-templáthoz kapcsolódása) és a kapcsolódott primerek 3'-végeinek kiterjesztése DNS-polimerázzal a PCR-primerek 5'-végeivel definiált szegmens meg sokszorozását eredményezi [White et al., Trends Genet. 5, 185–189 (1989)].

A találmány szerinti DNS-szekvenciák felhasználhatók különböző módokon a találmánynak megfelelően. A DNS-szekvencia legnyilvánvalóbb felhasználása PVA előállítására a V-penicillin 6-APA-vá történő átalakítása céljából. Felhasználhatók azonban DNS-próbáként is, más cDNS-ek és genomiális DNS-könyvtárak screenelésére, más olyan DNS-szekvenciák hibridizációval történő kiválogatására, amelyek a PVA-val rokon fehérjéket kódolnak. Ezenkívül a találmány szerinti, a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciák felhasználhatók mint DNS-próbák más cDNS-ek és genomiális DNS-könyvtárak screenelésére, olyan DNS-szekvenciák hibridizációval történő kiválogatására, amelyek a *Fusarium oxysporum*-tól eltérő szervezetekből származó PVA-molekulákat kódolnak.

A találmány szerinti, a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciák módosíthatók is (azaz mutációnak vethetők alá), különböző mutációk előállítására. Az ilyen mutációk lehetnek degeneráltak, azaz a mutációs változások megváltoztatják a mutációt szenvedett kodon által kódolt aminosavszekvenciát, vagy nem degeneráltak, azaz a mutáció nem változtatja meg a mutációt szenvedett kodon által kódolt aminosav sorrendet. Ezek a módosított DNS-szekvenciák elkészíthetők – például a PVA DNS-szekvencia oly módon történő mutációjával, hogy a mutáció a kódolt polipeptidben egy vagy több aminosav delécióját (kivágását), szubsztitúcióját (helyettesítését), inszercióját (beszúrását), inverzióját (megfordítását) vagy addícióját (betoldását) eredményezi – a szakterületen ismert különböző módszerek felhasználásával. Például alkalmazhatók a pontra irányított mutagenézis módszerei [Morinaga et al., Bio/Technol. 2, 636–639 (1984); Taylor et al. Nucl. Acids Res. 13, 8749–8764 (1985) és Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 482–492 (1985)]. Ráadásul a pontra irányított mutagenézishez szükséges kiték beszerezhetők a kereskedelemből. Például pontra irányított mutagenézis kivitelezésére szolgáló kit beszerezhető az Amersham Corp.-től (Arlington Heights; IL.). Ezenkívül szétszakításos, kivágásos és csonkolásos módszerek [Sayers et al., Nucl. Acids Res. 16, 791–802 (1988)] szintén alkalmazhatók. Degenerált és nem degenerált mutációk egyaránt előnyösek lehetnek

a találmány szerinti polipeptidek előállításában vagy felhasználásában. Például ezek a mutációk nagyobb mennyiségben történő előállítást, könnyebb tisztítást tesznek lehetővé, vagy további restrikciósendonukleáz-felismerő helyeket szolgáltatnak. Minden ilyenformán módosított DNS- és polipeptidmolekula a találmány oltalmi körébe tartozik.

A találmány tárgya továbbá a 7. ábrán (23. számú szekvencia) bemutatott új PVA-promoter. A találmány szerinti új promoter használható más hasznos fehérjéket vagy polipeptideket kódoló egyéb ismert DNS-szekvenciával.

A találmány tárgyát képezik továbbá a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciát és/vagy a PVA promotert tartalmazó expressziós vektorok. Az expressziós vektorok előnyösen olyan DNS-szekvenciák egyikének egészét vagy egy részét tartalmazzák, amelyek lényegében a 6. vagy 7. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciákkal rendelkeznek. Továbbá előnyben részesítjük az olyan expressziós vektorokat, amelyek egy vagy több szabályozó DNS-szekvenciát tartalmaznak a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciához működőképesen hozzákötve. Ebben az összefüggésben a „működőképesen hozzákötve” kifejezés azt jelenti, hogy a szabályozó DNS-szekvenciák képesek irányítani a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvencia replikációját és/vagy expresszióját.

A találmányban hasznosítható expressziós vektorok gyakran „plazmidok” formájában vannak jelen, amelyek olyan cirkuláris kettős szálú DNS-hurkokra utalnak, amelyek vektor formájukban nem kötődnek a kromoszómához. A találmány azonban az expressziós vektorok egyéb olyan formáit is felöleli, amelyek a szakmában ezután válnak ismertté.

A találmányban felhasználható expressziós vektorok tipikusan tartalmaznak egy replikációs origót, egy promotert (előnyösen a 23. számú szekvenciával rendelkező promotert) a DNS-szekvencia előtt (azaz upstream) és ezt követi egy strukturális fehérje egészét vagy annak egy részét – úgymint PVA-t, D-aminosav oxidázt, monoklonális antitesteket, inzulint, interferont, hám eredetű növekedési faktort, növekedési hormont és hasonlókat – kódoló DNS-szekvencia. A strukturális fehérje egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciát transzkripció terminációs szekvenciák és a maradék vektor követi. Az expressziós vektorok tartalmazhatnak egyéb, a szakmában ismert DNS-szekvenciákat, például stabilizációs szekvenciákat, amelyek gondoskodnak az expressziós termék stabilitásáról, szekréciós vezetőszekvenciákat, amelyek elősegítik az az expressziós termék kiválasztódását, szekvenciákat, amelyek lehetővé teszik a struktúrgén modulált kifejeződését (például tápanyagok vagy más prekursorok jelenlétével vagy hiányával a szaporító tápoldatban), markerszekvenciákat, amelyek képesek fenotípusos szelekciót biztosítani a transzformált gazdasejtekben, stabilitáselemeket, úgymint centromérákat, amelyek a plazmidnak mitotikus stabilitást nyújtanak, és olyan szekvenciákat, amelyek a restrikciós endonukleázok hasításához nyújtanak helyeket. Az éppen használt expressziós vektor tulajdonságainak össze-

egyeztethetőnek kell lennie az alkalmazandó gazdasejttel. Például ha egy gombasejtszrendszerbe klónozzuk, az expressziós vektornak tartalmaznia kell gombasejtek genomjából izolált promotereket (például a *trpC* promotert az *Aspergillus nidulans*-ból és a PVA-promotert a *Fusarium oxysporum*-ból). Bizonyos expressziós vektorok tartalmazhatnak gombából származó, autonóm módon replikálódó szekvenciát (ARS-t; például *Fusarium oxysporum*-ból és *Saccharomyces cerevisiae*-ből származó ARS-t), amely elősegíti az önállóan replikálódó plazmidok *in vivo* termelődését gomba-gazdasejtekben. Előnyben részesítjük, ha a találmány szerinti gomba-expressziósvektorok nem rendelkeznek a gomba ARS-szekvenciával, és így beépülnek a gazdasejt kromoszómájába a plazmid gazdasejtbe történő belépésével. Az ilyen beépülést előnyben részesítjük a fokozott genetikai stabilitás miatt. A találmány szándékai szerint egy expressziós vektor képes legalább az *Escherichia coli*-ban történő replikálódás és gombasejtekbe történő beépülés, és előnyösen a találmány szerinti PVA DNS-szekvenciák kifejeződésének irányítására. *E. coli* különböző gazdasejtek számára az alkalmas replikációs origók magukban foglalják például a CoIEI plazmid replikációs origót. A megfelelő promoterek felölelik például a *trpC* promotert az *Aspergillus nidulans*-ból, a PVA-promotert a *F. oxysporum*-ból és a *neo-r* gén promotert az *E. coli*-ból. A megfelelő terminációs szekvenciák közé tartoznak például a *trpC* vég az *Aspergillus nidulans*-ból, a PVA-vég a *F. oxysporum*-ból és a *neo-r* gén vége az *E. coli*-ból. Szintén előnyben részesítjük, ha az expressziós vektor szelekciós marker-szekvenciát tartalmaz. A szelekciós marker előnyösen antibiotikumrezisztencia. Szelekciós markerként phleomicinrezisztencia (gombasejtek számára), ampicillin- és neomicinrezisztencia (baktériumsejtek számára) kényelmesen alkalmazható. Ezen anyagok mindegyike ismert a szakmában, és kereskedelmileg hozzáférhető.

Különösen előnyben részesítjük az – alábbiakban itt leírt és a 10. ábrán bemutatott – PVA-t kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó pBMFXPVA6 jelölésű expressziós vektort, vagy a pBMFXPVA6-ot azonosító tulajdonságokkal rendelkező expressziós vektorokat. Szintén előnyben részesítjük az – alábbiakban itt leírt és a 8., 9., 11., 14. és 16. ábrákon külön-külön bemutatott – pWB19N, pSJC62, pBMFXPVA7, pBMPVA-P és pBMPVA-M jelű expressziós vektorokat, vagy a pWB19N-t, pSJC62-t, pBMFXPVA7-et, pBMPVA-P-t és pBMPVA-M-et azonosító tulajdonságokkal rendelkező expressziós vektorokat.

A pBMFXPVA7, pBMPVA-P és pBMPVA-M expressziós vektorokat külön-külön gazdasejtként tartalmazó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  törzset 1994. december 14-én helyeztük letétbe az American Type Culture Collection, Rockville, Maryland és a Budapesti Szervizelés rendelkezéseinek megfelelően az ATCC 69721, 69722 és 69720 nyilvántartási számok alatt.

A kívánt kódoló- és kontrollszekvenciákat tartalmazó megfelelő expressziós vektorokat összeállíthatjuk a szakmában ismert standard rekombináns DNS-technikák felhasználásával, amelyekből számosat leírunk

Sambrook és munkatársai [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

A találmány tárgyát képezik ezenkívül olyan expressziós vektort tartalmazó gazdasejtek, amelyek a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciát és/vagy a 23. számú szekvenciával rendelkező promotert foglalják magukban. A gazdasejtek előnyösen olyan expressziós vektort tartalmaznak, amely magában foglalja a lényegében a 6. és 7. ábrán bemutatott nukleotid-szekvenciával rendelkező DNS-szekvenciák valamelyikének egészét vagy egy részét. Továbbá előnyben részesítünk olyan gazdasejteket, amelyekben az expressziós vektor a replikáció és/vagy a kifejeződés irányítására képes egy vagy több szabályozó DNS-szekvenciát a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciához működőképesen kapcsolva tartalmazza. Ezenkívül beletartoznak olyan gazdasejtek, amelyekben az expressziós vektor oly módon módosított (például szétszakított, kivágott vagy csonkolt) DNS-szekvenciát foglal magában, amely katalitikusan nem aktív PVA-molekulát kódol. A megfelelő gazdasejtekbe egyaránt beleértünk eukarióta- és prokarióta-gazdasejteket, például *Escherichia coli* sejteket. Alkalmas eukarióta-gazdasejtek közé tartoznak például a *Cephalosporium acremonium*, *Fusarium oxysporum* és *Penicillium chrysogenum* sejtek.

Különösen előnyben részesítjük a *Fusarium oxysporum* törzseket mint gazdasejteket.

Expressziós vektorok bevezethetők a gazdasejtekbe a szakmában ismert különböző módszerekkel. Például a gazdasejt transzfekciója expressziós vektorokkal elvégezhető polietilén-glikol közvetítette protoplaszttranszformációs módszerrel. Az expressziós vektorok gazdasejtekbe történő bevitelére azonban más módszerek is alkalmazhatók, például elektroporáció, biolisztikus injekció vagy protoplasztfúzió.

Mihelyt bevezettük az expressziós vektort a megfelelő gazdasejtbe, a gazdasejtet tenyészthetjük olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a kívánt polipeptid – előnyben részesített esetben a PVA egészét vagy egy részét tartalmazó polipeptidmolekula – nagy mennyiségeinek kifejeződését.

Gazdasejtek, amelyek a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó expressziós vektort foglalnak magukban, azonosíthatók a következő hat általános megközelítés egyikével vagy többjével: a) DNS-DNS hibridizációval; b) markergénfunkciók jelenlétével vagy hiányával; c) a PVA mRNS-transzkriptumok keletkezésének mérése által a transzkripció szintjének megbecsülésével a gazdasejtben; d) a géntermék immunológiai kimutatásával; e) kolorimetriás kimutatással; és f) enzimmeghatározással; az enzim analízis az azonosítás előnyben részesített módszere.

Az első megközelítésben a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvencia jelenléte kimutatható DNS-DNS vagy RNS-DNS hibridizációval, a DNS-szekvenciával komplementer próbák felhasználásával.

A második megközelítésben a rekombináns expressziós gazdarendszer azonosítható és szelektálható markergén (például acetamid-hasznosítás, antibioti-

kumrezisztencia, fungicidrezisztencia, uracilprototrófia stb.) jelenléte vagy hiánya alapján. A markergén elhelyezkedhet ugyanabban a plazmidban, amelyben a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvencia, ugyanazon promotor vagy eltérő promotor szabályozása alatt, mint amelyet a PVA-t kódoló szekvencia szabályozására használunk. A markergén kifejeződése indukcióról vagy szelekcióra adott válaszként jelzi a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciát hordozó, teljes rekombináns expressziós vektor jelenlétét.

A harmadik megközelítésben a PVA mRNS-transzkriptumok keletkezését hibridizációs meghatározásokkal becsülhetjük meg. Például poliadenilált RNS-t izolálhatunk és analizálhatunk Northern blot vagy nukleáz-protektációs analízis segítségével, az RNS-szekvenciával komplementer próba felhasználásával. Más lehetőség szerint kivonhatjuk a gazdasejt teljes nukleinsavkészletét, és meghatározhatjuk ilyen próbákkal történő hibridizációval.

A negyedik megközelítésben a PVA egészének vagy egy részének kifejeződését megbecsülhetjük immunológiai, például Western blotol.

Az ötödik megközelítésben a PVA-fehérje kifejeződését megbecsülhetjük komplementációs analízissel. Például olyan sejtekben, amelyekről tudjuk, hogy hiányzik belőlük ez az enzim, a PVA-aktivitás kifejeződését kimutathatjuk egy szintelen szubsztrátnak, fenoxi-acetil-p-nitro-anilinnek sárga színű p-nitro-anilinné történő enzim hidrolízisével a táptalajlemezén.

A hatodik megközelítésben a PVA kifejeződése mérhető a PVA-enzim-aktivitás meghatározásával, ismert módszerek alkalmazásával. Például alkalmazhatjuk az „Előnyben részesített kiviteli alakok részletes példái” fejezetben leírt meghatározást.

A találmány szerinti expressziós vektorok, plazmidok vagy DNS-molekulák DNS-szekvenciáit meghatározhatjuk a szakmában ismert különböző módszerek segítségével. Például alkalmazhatjuk a didezoxilánc-terminációs módszert [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467 (1977)] vagy a Maxam-Gilbert-módszerrel [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560–564 (1977)].

Természetesen be kell látnunk, hogy nem minden expressziós vektor és DNS-szabályozószekvencia működik egyformán jól a találmány szerinti DNS-szekvenciák kifejeződésében. Nem működik egyformán jól minden gazdasejt sem ugyanazon expressziós rendszerrel. A mindennapos szakmai gyakorlat azonban szelektálhat az expressziós vektorok, DNS-szabályozószekvenciák és gazdasejtek között az itt nyújtott irányelvek alkalmazásával, aránytalanul sok kísérlet elvégzése és a találmány tárgykörétől való eltérés nélkül.

A találmány tárgyát továbbá PVA előállítására szolgáló eljárás képezi, amely magában foglalja egy PVA kifejezésére képes expressziós vektort tartalmazó gazdasejt tenyésztését. Az előnyben részesített expressziós vektor BMFXPVA6 vagy pBMFXPVA7. Meglepő módon azt találtuk, hogy a PVA termelődése lényegesen fokozódott fenoxi-acetát mint prekursor jelenlétében.

A találmány tárgyát képezik továbbá a PVA egészét vagy egy részét tartalmazó polipeptidmolekulák, amely nevezett polipeptidmolekulák előnyösen lényegében a 6. vagy 7. ábrán bemutatott aminosavszekvenciák egészével vagy egy részével rendelkeznek. A PVA egy részét tartalmazó polipeptidmolekulák esetében előnyben részesítjük a legalább körülbelül 10 aminosav hosszúságú polipeptidmolekulákat.

Minden itt azonosított aminosavmaradék természetes L-konfigurációjú. A standard polipeptid-nomenklatúrával [J. Biol. Chem. 243, 3557–3559 (1969)] összhangban az aminosavmaradékok rövidítéseit a következő táblázatban mutatjuk be.

| Szimbólum |         | Aminosav        |
|-----------|---------|-----------------|
| 1 betűs   | 3 betűs |                 |
| Y         | Tyr     | L-tirozin       |
| G         | Gly     | L-glicin        |
| F         | Phe     | L-fenilalanin   |
| M         | Met     | L-metionin      |
| A         | Ala     | L-alanin        |
| S         | Ser     | L-szerin        |
| I         | Ile     | L-izoleucin     |
| L         | Leu     | L-leucin        |
| T         | Thr     | L-treonin       |
| V         | Val     | L-valin         |
| P         | Pro     | L-prolin        |
| K         | Lys     | L-lizin         |
| H         | His     | L-hisztidin     |
| Q         | Gln     | L-glutamin      |
| E         | Glu     | L-glutaminsav   |
| W         | Trp     | L-triptofán     |
| R         | Arg     | L-arginin       |
| D         | Asp     | L-aszparaginsav |
| N         | Asn     | L-aszparagin    |
| C         | Cys     | L-cisztein      |

A leírásban bemutatott minden aminosavszekvencia balról jobbra haladva szerepel a szokásos, aminoterminálisról a karboxiterminális felé haladó irányban.

A találmány szerinti polipeptideket megkaphatjuk szintetikus úton, azaz a polipeptidet alkotó aminosavak kémiai szintézisével, a szakmában mindennapos gyakorlatként ismert módszerekkel. Például alkalmazhatjuk a Houghton és munkatársai által leírt [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5131–5135 (1985)] szilárd fázisú eljárást. Előnyben részesítjük, hogy a polipeptideket a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvenciának prokarióta- vagy eukarióta-gazdasejtekben történő kifejezésével előállítva, vagy a PVA egészét vagy egy részét kódoló DNS-szekvencia által kódolt mRNS *in vitro* transzlációjával kapjuk meg. Például a 6. vagy 7. ábra DNS-szekvenciája szintetizálható PCR alkalmazásával

– ahogyan azt fent leírtuk – és inszertálható egy megfelelő expressziós vektorba, amely viszont felhasználható megfelelő gazdasejt transzformálására. A rekombináns gazdasejt azután tenyészthető a PVA előállítására céljából. Polipeptidek ily módon történő előállítására szolgáló technikák ismertek a szakmában, és itt leírjuk azokat.

Az ilyen módon előállított polipeptideket azután izolálhatjuk és tisztíthatjuk valamilyen fokig különböző fehérjetisztítási technikák alkalmazásával. Például alkalmazhatunk kromatográfiás eljárásokat, úgymint ioncsere-  
10 relő kromatográfiát, gélsterű, réses kromatográfiát és immunaffinitás-kromatográfiát.

A 6-APA előállításán kívül a találmány szerinti polipeptidek felhasználhatók széles körben más területeken. Például a polipeptidek ismert módon felhasználhatók a polipeptidekhez kötődni képes poliklonális vagy monoklonális antitestek előállítására. Ezek az antitestek viszont felhasználhatók a találmány szerinti polipeptidek kimutatására mintában, például sejtmintában, immunoassay-technikák, például radioimmunoassay vagy enzim-immunoassay alkalmazásával. Az antitestek felhasználhatók affinitáskromatográfiában a találmány szerinti polipeptidek tisztítására és ezeknek különböző forrásokból történő izolálására.

A találmány szerinti polipeptideket meghatározott DNS és abból levezetett aminosavszekvenálás segítségével definiáltuk. A genetikai kód degenerációs természete miatt – amely a legtöbb aminosavmaradékra és stopszignálra több mint egy kodon létezését eredményezi – más DNS-szekvenciák, amelyek ugyanazt az aminosavszekvenciát kódolják, mint amelyet a 6. és 7. ábrán ábrázoltunk, alkalmazhatók a találmány szerinti polipeptidek előállítására. Ezenkívül érthető, hogy ezeknek a DNS és aminosavszekvenciáknak allélmódusai a természetben léteznek, vagy szándékosan előidézhetők a szakmában ismert módszerek felhasználásával. Ezek a változatok megmutathatók az egész szekvencia mentén egy vagy több aminosav eltéréssel, vagy a nevezett szekvenciában egy vagy több aminosav kivágásával, helyettesítésével, beszúrásával, megfordításával vagy betoldásával. Ilyen aminosavhelyettesítések megvalósíthatók például a részt vevő aminosavmaradékok polaritásának, töltésének, oldhatóságának, hidrofób vagy hidrofíl jellegének és/vagy amfipátias hasonlósága alapján. Például negatív töltésű aminosavak közé tartoznak az aszparaginsav és glutaminsav; pozitív töltésű aminosavak közé a lizin, és arginin; a töltéssel nem rendelkező poláros főcsoportot tartalmazó és az apoláros főcsoportot tartalmazó, hasonló hidrofíl jelleggel rendelkező aminosavak a következők: leucin, izoleucin, valin, glicin, alanin, aszparagin, glutamin, szerin, treonin, fenilalanin, tirozin. Egyéb szemléltető változatok felölelik az említett polipeptidek sóit és észterit ugyanúgy, mint az említett polipeptidek prekursorait, például N-terminális szubsztituensekkel – úgymint metioninnal, N-formil-metioninnal – rendelkező prekursorokat és vezérszekvenciákat. Mindezek a változatok beletartoznak a találmány tárgykörébe.

A következő példák további szemléltetései a találmánynak. Ezek a példák nem jelentik az oltalmi kör

korlátozását, és a találmány további megértését szolgálják.

*Előnyben részesített kiviteli alakok részletes példái*

A példákban a mikrobatorzseket, plazmidokat, puffert, szaporító táptalajokat és szokásos módszereket a következők szerint írjuk le.

*Mikrobatorzsek és plazmidok*

A felhasznált plazmidokat, baktérium- és gombatorzseket az 1. táblázatban soroljuk fel.

1. táblázat

| Törzsek és plazmidok                                | Fontos tulajdonságok                                                                                                                                          | Referencia             |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5α                        | F-φ80d <sub>lacZ</sub> ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1 | Life Technologies Inc. |
| <i>Fusarium oxysporum</i> 435 törzs                 | V-penicillin amidáz termelő                                                                                                                                   | új izolátum            |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | ATCC törzs                                                                                                                                                    | ATCC 16322             |
| pBM11/M5                                            | Neo <sup>R</sup> , 5,6 kb                                                                                                                                     | ATCC 67436             |
| pES200                                              | Amp <sup>R</sup> , HygB <sup>R</sup> , 6,2 kb                                                                                                                 | (1)                    |
| pUC19                                               | Amp <sup>R</sup> , 2686 bp                                                                                                                                    | (2)                    |
| pUT715                                              | Amp <sup>R</sup> , 3337 bp                                                                                                                                    | (3)                    |
| pUT715/trpC                                         | Amp <sup>R</sup> , PhI <sup>R</sup> , 4,6 kb                                                                                                                  | *, 9. ábra             |
| pWB19N                                              | Neo <sup>R</sup> , 2,9 kb                                                                                                                                     | *, 8. ábra             |
| pSJC62                                              | Neo <sup>R</sup> , PhI <sup>R</sup> , 5,3 kb                                                                                                                  | *, 9. ábra             |
| pF020                                               | Amp <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 6,3 kb                                                                                                                  | *, 12. ábra            |
| pF020-P                                             | Amp <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 6,3 kb                                                                                                                  | *, 13. ábra            |
| pF020-M                                             | Amp <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 6,3 kb                                                                                                                  | *, 15. ábra            |
| pF021                                               | Neo <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 15 kb                                                                                                                   | *, 5. ábra             |
| pF023                                               | Neo <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 9,2 kb                                                                                                                  | *, 5. ábra             |
| pBMFXPVA6                                           | Neo <sup>R</sup> , PhI <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 10,3 kb                                                                                              | *, 10. ábra            |
| pBMFXPVA7                                           | Neo <sup>R</sup> , PhI <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 14,6 kb                                                                                              | *, 11. ábra            |
| pBMPVA-P                                            | Amp <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 6,3 kb                                                                                                                  | *, 14. ábra            |
| pBMPVA-M                                            | Amp <sup>R</sup> , PVA <sup>+</sup> , 6,3 kb                                                                                                                  | *, 16. ábra            |
| pBMPVA-P/DA01                                       | Amp <sup>R</sup> , DAAO <sup>+</sup> , 6,8 kb                                                                                                                 | *, 17. ábra            |
| pBMPVA-P/DA02                                       | Neo <sup>R</sup> , PhI <sup>R</sup> , DAAO <sup>+</sup> , 8,7 kb                                                                                              | *, 17. ábra            |
| pBMPVA-M/DA03                                       | Amp <sup>R</sup> , DAAO <sup>+</sup> , 6,9 kb                                                                                                                 | *, 18. ábra            |
| pBMPVA-M/DA04                                       | Neo <sup>R</sup> , PhI <sup>R</sup> , DAAO <sup>+</sup> , 8,8 kb                                                                                              | *, 18. ábra            |

(1) Staben et al., Fungal Genet. Lett. 36, 79–81 (1989)

(2) Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103–119 (1985)

(3) Jain et al., Mol. Gen. Genet. 234, 489–493 (1992)

\* ezután írjuk le

*Pufferek és táptalajok*

Luria leves: 1% Difco Bacto tripton, 0,5% Difco Bacto élesztő kivonat, 0,5% nátrium-klorid.

Luria agar: 1,5% Difco Bacto agarral kiegészített Luria broth.

SOC tápoldat: 2% Difco Bacto tripton, 0,5% Difco Bacto élesztő kivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl. Autoklavozás után egy századrész térfogat 1 M MgCl<sub>2</sub>-ot, 1 M MgSO<sub>4</sub>-ot és 20% glükózt adunk a tápoldathoz.

*Fusarium* vegetatív szaporító tápoldat: 6% keményítő, 4% Pharmamedia (Trader Protein, Memphis, TN), 0,3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,75% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,75% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH-állítás 6,8-ra 10 M NaOH-dal.

PVA-termelő tápoldat: *Fusarium* vegetatív szaporító tápoldat 0,4% fenoxi-acetáttal kiegészítve.

Tris-acetát elektroforézispufer (TAE): 40 mM Tris-acetát (pH 8,0), 1 mM EDTA.

20×SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát, pH-állítás 7,0-re 10 M NaOH-dal.

20×SSPE: 3 M NaCl, 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA, pH-állítás 7,0-re 10 M NaOH-dal.

50×Denhardt-oldat: 1% Ficoll, 1% poli(vinil-pirrolidon), 1% marhaszérum-albumin (bovine serum albumin=BSA).

30×NET: 4,5 M NaCl, 0,45 M Tris-HCl (pH 7,5), 30 mM EDTA.

*Módszerek*

Általános klónozási technikákat használtunk, DNS-szekvenálást és plazmid DNS-kivonást *E. coli*-ból Sambrook és munkatársai leírása szerint [„Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. Minden restriktációs enzim és DNS-módosító enzim kereskedelmi forrásból szereztünk be. Ezeket a gyártó utasításai szerint használtuk. Egyéb gyakran használt módszereket a következők szerint végeztünk.

1. *Az E. coli elektrotranszformációja (elektroporációja)*

*E. coli* DH5α, sejtek friss, egyéjszakás tenyészetének 4 ml-ét inokuláltuk 400 ml Luria levesbe, és szaporítottuk 37 °C-on történő rázatással 0,6 OD<sub>600</sub> értékig. A sejteket 15 percig tartó jégen tartással és hideg rotorral: 7000×g-vel 10 perces centrifugálással nyertük ki. A sejt pelletet kétszer mostuk 200 ml 0 °C-os vízzel és egyszer 10 ml 0 °C-os 10%-os glicerinnel. A sejt pelletet újra szuszpendáltuk 1 ml végső térfogatra (1–3×10<sup>10</sup> sejt/ml) 0 °C-os, 10%-os glicerinnel. A sejt szuszpenziót 1,5 ml-es polipropilén csövekben 40 μl-es kis részletekben szárazjégen lefagyasztottuk, és –70 °C-on tároltuk.

A fagyott sejteket szobahőmérsékleten felengedték, és azután azonnal jégre tettük. Körülbelül 2–3 μl DNS-t, TE-ben vagy ligációs keverékben adtunk a sejtekhez, gyengéden kevertük, és 1 percre jégre tettük. A keveréket ezután átvittük egy előre lehűtött, 0,2 cm-es elektroporációs küvetába (Bio-Rad catalog #165–2086, Bio-Rad Laboratories, Inc.). A Bio-Rad Gene Pulser berendezést (Bio-Rad catalog #165–2075) 25 μF kapacitásra és 2,50 kV feszültségre állítottuk be. A Pulse Controllert (Bio-Rad catalog #165–2098) 200 ohm el-

lenállásra állítottuk. A küvétát egyszer pulzáltuk ennél a beállításnál. Az elektroporáció után 1 ml SOC tápoldatot adtunk a küvétához. A sejtszuszpenziót Pasteur-pipettával átvittük egy 17×100 mm-es polipropilénscsőbe, és 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. A sejteket szelektív táptalajra (40 µg/ml neomicint vagy 100 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria agarra) szélesztettük.

## 2. *Fusarium* protoplaszt-transzformáció

*Fusarium oxysporum* törzseket tenyésztettünk 20 ml burgonyadextróz levesben (potato dextrose broth=PDB; Difco Laboratories) 24 °C-on. A mikrokonídiumokat átszűrtük egy 30 µm lyukméretű nejlonszűrőn (Spectra/Mesh Nylon N, Spectrum Medical Industries, Inc.). A mikrokonídiumokat szobahőmérsékleten, 1500×g-vel 8 percig történő centrifugálással pelletáltuk. A mikrokonídiumokat kétszer mostuk steril desztillált vízzel. Körülbelül  $1 \times 10^{10}$  mikrokonídiumot csíráztattunk ki 100 ml PDB-ben 24 °C-on 15 órán át történő rázatással. A kicsírázott mikrokonídiumokat szobahőmérsékleten, 1500×g-vel 8 percig történő centrifugálással gyűjtöttük össze steril 50 ml-es kúpos csövekben. A pelletet kétszer mostuk O pufferrel (1,4 M MgSO<sub>4</sub>, 50 mM nátrium-citrát, pH 5,8). A kicsírázott mikrokonídiumokat 2% Novozyme 234-et (BiosPacific, Inc.) tartalmazó O puffer 20 ml-ével kezeltük 1–2 óráig 24 °C-on. Amikor 90%-nál több protoplaszt képződött, a keveréket két 15 ml-es kúpos csőben 900×g-vel 30 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A protoplasztokat pipettával óvatosan leszívtuk a szuszpenzió tetejéről, és kétszer mostuk T pufferben (1,2 szorbit, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) 4 °C-on. A protoplasztokat  $1 \times 10^9$ /ml koncentrációban szuszpendáltuk 6% polietilénlikol–4000-et és 1% dimetil-szulfoxidot tartalmazó T pufferben. A protoplasztokat kis részletekben, 1,5 ml-es polipropilénscövekben szárazjégen lefagyasztottuk, és –70 °C-on tároltuk.

A protoplasztokat a fagyott szuszpenzió szobahőmérsékleten történő felengedésével és 2 mM végső koncentrációjú aurin-trikarboxilát nukleáz inhibitor hozzáadásával transzformáltuk. 10 µl TE-ben 10–20 µg plazmid DNS-t adtunk a protoplasztsuszpenzió 200 µl-éhez, és 30 percig jégen tartottuk. 60% polietilénlikol–4000/50 mM CaCl<sub>2</sub> oldatát adtuk két 200 µl-es és egy 800 µl-es térfogatban gyengéd kevertetés mellett minden hozzáadás között, és 30 percig jégen tartottuk. Azután 1,2 M szorbit/0,5×PDB 10 ml-ét adtuk hozzá kíméletes keverés mellett. A protoplasztokat 900×g-vel 8 percig 4 °C-on történő centrifugálással pelletáltuk. A pelletet 1,2 M szorbit/0,5×PDB 0,5 ml-ében szuszpendáltuk. A protoplasztsuszpenzió 0,1 ml-ét 1,2 M szorbit/0,5×PDB/1,5% agar összetételű – két rétegben frissen kiöntött – lemezre szélesztettük. Az alsó réteg 12,5 ml táptalajt tartalmazott 75 µg/ml phleomicinnel, amely lassan átdiffundált a felső rétegben levő 12,5 ml táptalajba. A lemezeket 24 °C-on inkubáltuk 7 napig. A transzformátumokat a 20 µg/ml phleomicint tartalmazó 1×PDA táptalajon történő növekedéssel és a plazmid DNS-próbával végzett DNS dot-blot hibridizációval igazoltuk.

## 3. A kromoszomális DNS kivonása *Fusarium* törzsek-ből

*Fusarium* protoplasztokat készítettünk, ahogyan azt a „*Fusarium* protoplaszt-transzformáció” fejezetben leírtuk. Miután a protoplasztokat összegyűjtöttük a szuszpenzió tetejéről és kétszer mostuk T pufferben 4 °C-on, a protoplasztokat újrászuszpendáltuk 4 ml lízispufferben [0,7 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA és 1% nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate=SDS)], gyengéden kevertük és 5 percig 37 °C-on inkubáltuk. Egytized térfogat 10%-os hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot (CTAB) 0,7 M NaCl-ban adtunk a protoplasztlizátumokhoz, óvatosan kevertük, és 15 percig 65 °C-on inkubáltuk. A kromoszomális DNS-t megegyező térfogatú kloroform:izoamil-alkohol (24:1) keverék hozzáadásával extraháltuk. Összegyűjtöttük a vizes oldatot, és 6/10 térfogat izoamil-alkoholt adtunk hozzá a kromoszomális DNS kicsapása céljából. A DNS-t szobahőmérsékleten 5 percig tartó 1500×g centrifugálással gyűjtöttük össze. A DNS-t egyszer mostuk 70%-os etanollal, vákuum alatt szárítottuk. A DNS-t újrászuszpendáltuk 200 µg/ml ribonukleáz A-t (EC 3.1.27.5, Sigma Chemical Co.) tartalmazó 1 ml TE-ben és 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Egy proteínáz K oldat (EC 3.4.21.14, Boehringer Mannheim, GmbH) készítményt adtunk hozzá 400 µg/ml végső koncentrációban, és a DNS-oldatot 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. 1/10 térfogat 3 M NaCl-oldatot adtunk hozzá, és a DNS-oldatot kétszer extraháltuk megegyező térfogatú fenol:kloroform:izoamil-alkohol (25:24:1) keverékkel. A vizes oldatot összegyűjtöttük, és két térfogat etanolt adtunk hozzá a kromoszomális DNS kicsapása céljából. A DNS-t azután szobahőmérsékleten 5 percig tartó 1500×g centrifugálással gyűjtöttük össze. A DNS-t egyszer mostuk 70%-os etanolban, vákuum alatt szárítottuk, és újrászuszpendáltuk 1 ml TE-ben.

## 4. A DNS megjelölése

DNS-próbákat készítettünk plazmid DNS-ből vagy agarózzal tisztított DNS-fragmentumokból, és megjelöltük α-<sup>32</sup>P-dCTP-vel (Amersham Corp.) a Nick transzlációs rendszer (Life Technologies, Inc.) felhasználásával. Oligonukleotidpróbákat foszforileztünk γ-<sup>32</sup>P-ATP-vel (Amersham Corp.) T4 polinukleotid kináz enzim segítségével. A megjelölt próbák bármelyik felhasználása előtt a DNS-próbákat hővel denaturáltuk 100 °C-on 5 percig, és gyorsan lehűtöttük jégen 2 percig.

## 5. DNS dot-blot hibridizáció

DNS-mintákat 0,4 M NaOH, 10 mM EDTA keverékével 0,4 ml teljes térfogatban hővel denaturáltunk 100 °C-on 10 percig, és BioRad Zeta-probe GT membránra (Bio-Rad Laboratories, Inc.) vagy nitro-cellulóz-membránra (Minifold, Schleicher & Schnell, Inc.) vittük fel vákuum alatt egy dot-blot berendezésben (Minifold, Schleicher & Schnell, Inc.). Hibridizációt végeztünk hibridizációs kemencében (Laboratory Products Sales, Inc.). A Zeta-probe GT membránt egy palackba helyeztük, és előhibridizáltuk 5 ml hibridizációs pufferrel (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, 7% SDS) 65 °C-on 2 órás forrással. Azután az oldatot 5 ml frissen készített hibridizációs pufferrel cseréltük le. Hozzáadtuk a megjelölt DNS-próbát és hibridizációt végeztünk 16–24 órán át 65 °C-on forrással. A hibridizált



membránt kétszer mostuk 65 °C-on egyenként 30 per-  
cig, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-et (pH 7,2) és 5% SDS-t tartal-  
mazó pufferben. A membránt ezt követően még két-  
szer mostuk 65 °C-on 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-et (pH 7,2) és  
1% SDS-t tartalmazó pufferben. Amikor nitro-cellu-  
lóz-membránt használtunk, a hibridizációt hasonló kör-  
ülmények között végeztük el, kivéve a hibridizációs  
puffer összetételét, amely 6×SSC, 5×Denhardt-oldat,  
10 mM kálium-foszfát (pH 7,2), 0,1% SDS és ml-en-  
ként 250 µg denaturált lazacsperma-DNS volt. A hib-  
ridizált membránt kétszer mostuk 65 °C-on egyenként  
30 perig, 2×SSC, 0,1% SDS keverékével, amelyet két  
30 perces, 65 °C-on történő mosás követett 0,1×SSC,  
0,1% SDS keverékével. Ha oligonukleotidpróbát hasz-  
náltunk, a hibridizáció és a mosás hőmérsékletét  
50 °C-on tartottuk. Mosás után a membránt Kodak  
XAR-5X-ray filmre (Eastman Kodak Co.) exponáltuk  
autoradiográfiához.

#### 6. Southern DNS-hibridizáció

*Fusarium* kromoszomális DNS-t emésztettünk befe-  
jezésül néhány különböző restrikciós enzim mindegyi-  
kével, és 0,25 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó TAE  
pufferben 0,8%-os agarózgélben keresztül elektrofore-  
tizáltuk. A gélét savas depurinációval, alkalikus dena-  
tációval és neutralizációval kezeltük Sambrook és mun-  
katársai leírása alapján, és Bio-Rad Zeta-probe GT  
membránra vagy nitro-cellulóz-membránra vittük fel  
Bio-Rad Model 785 Vacuum Blotter (Bio-Rad cata-  
log #165–5000) alkalmazásával. A DNS-hibridizációt  
és autoradiográfiát a fent leírtak szerint végeztük el.

#### 7. V-penicillin amidohidroláz enzim meghatározása

Konídiumokat izoláltunk *Fusarium oxysporum*  
törzs 1 hetes burgonyadextróz agaros (PDA, Difco La-  
boratories) lemezeiről a felület 5 ml steril desztillált  
vízzel való mosásával. A konídiumokat tartalmazó ol-  
dat 0,5 ml-ével inokuláltunk 25 ml *Fusarium* vegetatív  
szaporító tápoldatot 125 ml-es lombikban. A vegetatív  
tenyészetet 72 óráig szaporítottuk forgató rázógépen  
(250 rpm) 24 °C-on, és a vegetatív tenyészet 0,2 ml-es  
kis mennyiségét inokuláltuk 25 ml PVA termelő tápol-  
datba 125 ml-es lombikban. A tenyésztést forgató rázó-  
gépen végeztük 24 °C-on 144 órán keresztül.

A termelőtenyészetet először 5 mM kálium-foszfát-  
pufferben (pH 7,5) hígítottuk. Megfelelően hígított  
tenyészet 1 ml-ét adtuk 1 ml, 25 mM kálium-foszfát-  
pufferben (pH 7,5) készített 3% os V-penicillin oldat-  
hoz. A reakciókeveréket 35 °C-on 15 perig rázattuk,  
és leállítottuk 1 ml 6%-os (w/v) triklór-ecetsav-oldattal  
(trichloroacetic acid=TCA). A keveréket centrifugáltuk  
1500×g-vel 8 perig. A tiszta felülúszó 1 ml-ét adtuk  
3 ml p-(dimetil-amino)-benzaldehyd (p-DAB) munkaol-  
dathoz, amelyet 1 rész 100-os metanolban oldott 1% p-  
DAB és 6 rész ecetsav: víz: 1 M NaOH (40:19:1) keve-  
rékének összeöntésével készítettünk. A keveréket szoba-  
hőmérsékleten tartottuk 5 perig, és 415 nm-en optikai  
denzitást mértünk. Az 1 ml 100 µg/ml 6-APA-t és 3 ml  
p-DAB munkaoldatot tartalmazó kontrollcső 0,27 opti-  
kaidenzitás-értéket eredményezett 415 nm-en. Az en-  
zimaktivitást (NE/ml) a 415 nm-en leolvasott optikai-  
denzitás-értéknek a hígítási faktorról és 0,34 szorzóté-

nyezőnek a szorzatával számítottuk ki. A V-penicillin  
amidohidroláz-aktivitást nemzetközi egységben (NE)  
jeleztük ki, egy egység ekvivalens percenként 1 µmol V-  
penicillin átalakításával a fenti meghatározási körülmé-  
nyek között.

#### 1. példa

##### V-penicillin amidáz aminosavszekvenciája

A PVA-enzim szekretált formáját izoláltuk, tisztított-  
tuk és jellemeztük. Ez egy 65 kDa molekulatömegű  
glikoprotein. A tisztított enzimet bróm-ciánnal emésztet-  
tük. A bróm-ciánnal emésztett PVA géliszűrési kroma-  
tográfiája Sephadex G-100 oszlopon hat főfragmentum  
– A, B1, B2, C, D és E – tisztítását tette lehetővé. Mind  
a hat peptidfragmentum, mind az érintetlen PVA-mo-  
lekula N-terminális aminosavszekvenciáját automatizált  
Edman-degradációs módszerrel [Hunkapiller és Hood,  
Science 219, 650–659 (1983)] határoztuk meg. A kap-  
ott peptidszekvenciákat az 1. ábrán mutatjuk be.

#### 2. példa

##### V-penicillin amidáz cDNS klónozása

1. Az mRNS kivonása a *Fusarium oxysporum*  
435 törzsből

*Fusarium oxysporum* 435 törzs sejtjeit szaporítottuk  
PVA termelő tápoldatban, mostuk és újrászuszpendál-  
tuk guanidin-izotiocianát-pufferben, és szonifikáltuk a  
sejtek szétroncsolása céljából. Teljes RNS-t izoláltunk  
CsCl-párnán keresztül történő centrifugálással [Glisin  
et al., Biochem. 13, 2633–2637 (1974)]. mRNS-t ké-  
szítettünk oligo(dT) kromatográfiával [Sambrook et al.,  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.  
(1989)], amelyet szacharózzradiens frakcionálás köve-  
tett. Minden frakcióban *in vitro* transzlációval és im-  
munprecipitációval határoztuk meg a mRNS-t.

#### 2. cDNS szintézise és cDNS-könyvtár készítése

Komplementer DNS-t (cDNS-t) készítettünk mRNS-  
ből a Gubler–Hoffman-féle eljárást követve [Gubler és  
Hoffman, Gene 25, 263–269 (1983)]. Az első szálát  
50 µl reakciókeverékben szintetizáltuk, amely 3 µg  
mRNS-t, 50 mM Tris–HCl-ot (pH 7,5), 65 mM KCl-ot,  
3 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 10 mM DTT-t, 0,5 µg oligo (dT)-t,  
2,5 µg actinomicin D-t, 4 dNTP mindegyikéből 1 mM-t  
és 2 egység Muréna Leukémia Vírus (MLV) reverz  
transzkriptázt. A reakciót 0 °C-on 3 perig, azután  
20 °C-on 5 perig és 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. 2 µl  
EDTA-t és 5 µl 3 M NaCl-ot adtunk hozzá a reakció vé-  
gén. A keveréket fenol/kloroform elegyével extraháltuk,  
és kicsaptuk 2 térfogat etanollal. A második szálát repair  
szintézises reakcióval készítettük el RN-áz H, DNS-po-  
limeráz és DNS-ligáz felhasználásával. Az első szál szin-  
téziséből kapott DNS-t 100 µl repair pufferben oldottuk,  
amely 20 mM Tris–HCl-ot (pH 7,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot,  
10 mM ammónium-szulfátot, 100 mM KCl-ot, 150 µM  
β–NAD-ot, 4 dNTP mindegyikéből 40 µM-t, 5 µg  
BSA-t, 1 egység *E. coli* RN-áz H-t, 40 egység DNS-  
polimeráz I-et és 1 egység *E. coli* DNS-ligázt tartalma-  
zott. A keveréket 12 °C-on 1 órán át inkubáltuk, és azu-  
tán még 1 órát 20 °C-on. A reakció végén 10 µl 3 M  
NaCl-ot adtunk hozzá, és a keveréket fenol/kloroform

elegyével extraháltuk. A DNS-t kicsaptuk 2 térfogat etanol hozzáadásával. A cDNS C-végét terminális dezoxinukleotidil-transzferáz (TdT) és dCTP felhasználásával farkaztuk. A C-farkazott cDNS 1 ng-ját annealingnek vettük alá, és G-farkazott pUC19 plazmid 25 ng-jával ligáltuk. A ligált DNS-t felhasználtuk *E. coli* transzformálására és cDNS-könyvtár elkészítésére.

### 3. Oligonukleotidpróbák készítése

Négy oligonukleotidpróbából álló sorozatot (2. ábra, 11. számú szekvencia) származtattunk a PVA-enzim karboxilvégéhez közel eső C peptidből (1. ábra, 5. számú szekvencia) származó hét aminosav (8. számú szekvencia) reverz translációjával.

### 4. A PVA cDNS-klón azonosítása és teljes hosszúságú cDNS létrehozása

A cDNS-könyvtár telepeit degenerált oligonukleotidpróbával (2. ábra, 11. számú szekvencia) screeneltük. Kolóniablotokat screeneltünk a végeken  $^{32}\text{P}$ -vel jelölt próbakkal történő hibridizációval, hibridizációs puffert (6×NET/10×Denhardt/1% SDS) 50 °C-on.

A hibridizált membránt kétszer mostuk szobahőmérsékleten 2×NET/0,1% SDS keverékével egyenként 30 percig, amelyet két 30 perces mosás követett 50 °C-on 0,5×NET/0,1% SDS keverékével. Egy erősen hibridizáló telepet (#362) kiválasztottunk további vizsgálatához. Ez egy 500 bp inszertumot tartalmazott, amelyet próbaként használtunk a könyvtár újrascreeeléséhez. A második klón (#2585) egy 1,7 kb inszertumot tartalmazott, és erősen hibridizált a próbával. A PVA N-terminális aminosavszekvenciájának összehasonlítása az inszertum 5'-végének translációjával azt jelzi, hogy az érett enzim teljes kódolórégiója öt aminosav kivételével klónozva lett (3. ábra). PstI restrikciós hasítási helyet hoztunk létre az 5'-végen pontmutációval #2585–M előállítására. Szintetikus linkert adtunk hozzá a #2585–M klónnak teljes hosszúságú cDNS-klónná, 2585–FL-lé történő átalakítása céljából (3. és 4. ábra).

### 5. A 2585–FL cDNS-klón DNS-szekvencia-analízise

A 2585–FL cDNS-inszertum mindkét szálát szekvenáltuk a Maxam–Gilbert-féle módszer segítségével [Maxam és Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560–564 (1977)]. Az inszertum tartalmaz egy 1521 bp hosszúságú nyílt leolvasási keretet, amely egy 55 000 Da fehérjét kódolhat (6. ábra). Az érintetlen PVA-molekula és a bróm-ciánnal emésztett peptidfragmentumok N-terminálisából az aminosavszekvencia-adatok mindegyike megtalálható ebben a szekvenciában. A régiót (1348–1368. bp, 20. számú szekvencia), amely megfelel a 20 tagú oligonukleotidpróbának (11. számú szekvencia) aláhúztuk a 6. ábrán.

### 3. példa

#### *V-penicillin amidáz genomiális DNS klónozása*

#### 1. A genomiális PVA-génfragmentum azonosítása

*Fusarium oxysporum* 435 törzsből származó, nagy molekulatömegű kromoszomális DNS-t emésztettünk néhány restrikciós enzimmal, TAE pufferben 0,6%-os agarózgélben keresztül elektroforezizáltuk és nitro-celulóz-membránra vittük át. A 2585 inszertum DNS-ből

készített próbát hibridizáltuk a Southern blotra a PVA-gént tartalmazó fragmentumok méretének meghatározása céljából. A gént egy körülbelül 12 kb EcoRI fragmentumon találtuk meg.

#### 2. A pWB19N plazmid összeállítása

A pBM11/M5 (ATCC 67436) plazmidot a pBM11-ből (ATCC 67366) származtatjuk, amelyben a neomicinrezisztencia-génben jelen levő NcoI helyet pontmutációval eltávolítottuk. A pBM11/M5 plazmid DNS-t HindIII-mal és SmaI-gyel emésztettük. A HindIII hasítástól eredő kiugró 5'-végeket tompa végekké alakítottuk át az *E. coli* DNS-polimeráz I Klenow-fragmentumának felhasználásával. A DNS-keveréket elektroforézisnek vettük alá 0,8%-os preparatív agarózgélben. A neomicinrezisztencia-gént tartalmazó 1,3 kb fragmentumot kivágtuk a gélből, és elektroelúciónak vetettük alá 100 V mellett 1 órán át szobahőmérsékleten. Az eredményül kapott eluátumot összegyűjtöttük, és 3-szor extraháltuk azonos térfogatú, TE-vel telített fenollal. A DNS-t 0,3 M NaCl jelenlétében etanolos kicsapással visszanyertük a vizes fázisból. A DNS-fragmentum visszanyerését agarózgél-elektroforézissel analizáltuk.

A pUC19 plazmid DNS-t [Yanisch–Perron et al., Gene 33, 103–119 (1985)] BspHI-vel hasítottuk, és a kiálló 5'-végeket Klenow-fragmentummal tompa végekké alakítottuk. A polilinkerhelyeket és a replikáció eredetét tartalmazó 1,6 kb fragmentumot (2639–2686. bp és 1–1526. bp) izoláltuk, és ligáltuk az 1,3 kb neomicinrezisztenciagén-fragmentumhoz ligációs puffer (50 mM Tris–HCl pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% polietilén-glikol–8000) és T4 DNS-ligáz jelenlétében.

Az eredményül kapott pWB19N plazmidot elektroporációval *E. coli* DH5α sejtekbe juttattuk. Neomicinrezisztens telepeket screeneltünk pWB19N plazmid jelenlétére, amely rendelkezik egy helyreállított BspHI hellyel a Klenowval feltöltött HindIII és BspHI helyek elágazási pontjában. A telepeket ampicillinérzékenység-re, és X-gal lemezekben β-galaktózidázaktivitás α-komplementációjára is screeneltük. A pWB19N szerkezetét a 8. ábrán szemléltettjük.

#### 3. A genomiális PVA-génfragmentum klónozása

100 µg, *Fusarium oxysporum* 435 törzsből származó nagy molekulatömegű kromoszomális DNS-t hasítottunk EcoRI-vel. A DNS-t elektroforézisnek vetettük alá TAE pufferben 0,6%-os agarózgélben keresztül. A 11,5–12 kb méretű DNS-t kivágtuk a gélből, és elektroelúciónak vetettük alá 100 V mellett 1 órán át szobahőmérsékleten. Az eredményül kapott eluátumot összegyűjtöttük, és háromszor extraháltuk megegyező térfogatú, TE-vel telített fenollal. A DNS-t 0,3 M NaCl jelenlétében etanolos kicsapással visszanyertük a vizes fázisból. A körülbelül 12 kb DNS-fragmentumot azután a pWB19N vektorba klónoztuk pF021-et képezve (5. ábra). A pF021 DNS restrikciós analízise feltárta, hogy a klónozott fragmentum tartalmazza a teljes PVA gént, a PVA-t kódoló szekvenciák további 3,7 kb upstream és 6,8 kb downstream szekvenciáival együtt.

#### 4. DNS-szekvencia-analízis

A genomialis klón kódolórégióját szintén a Maxam–Gilbert-féle módszerrel szekvenáltuk (7. ábra). A cDNS- és genomialis szekvenciák azonosak voltak, kivéve az 5'-végen való kodonhasználatot és azt a helyet, ahol a szintetikus linker beékelődött a cDNS-klónba. A genomialis klónban további 315 bp szekvenciainformációt szereztünk az 5'-végen. Ez az adat azt sugallja, hogy a PVA mRNS-transzlációja a 7. ábra 241. bázisánál kezdődik, és hogy egy 25 aminosav hosszúságú szignálszekvenciát tartalmazó „elő-PVA” szintetizálódik és azután elhasad, kialakítva a PVA-enzim szekretált formáját.

A transzkripció starthelyét S1-térképezéssel állapítottuk meg [Berk és Sharp, Cell 12, 721–732 (1977); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)]. Ez a 162. bázisnál vagy annak közelében helyezkedik el. Nem találtunk más potenciális ATG transzlációs startszignálokat ezen hely és a 241. bázisnál elhelyezkedő ATG között.

#### 4. példa

##### PVA-gén-expresszió heterológ gazdaszervezetekben

##### 1. A pSJC62 plazmid összeállítása

A pES200 plazmid [Staben et al., Fungal Genet. Lett. 36, 79–81 (1989)] rendelkezik az *Aspergillus nidulans*-ból származó trpC promotorszekvenciával a bakteriális hygromicin B rezisztenciagén transzkripciójának irányítására. A pSE200 DNS-t EcoRI és ClaI enzimekkel hasítottuk; a kiálló 5'-végeket Klenow-fagmentummal tompa végekké alakítottuk. Az 1250 bp trpC promoterfragmentumot agarózgél-elektroforézissel izoláltuk, és visszanyertük elektroelúcióval. A pUT715 plazmid [Jain et al., Mol. Gen. Genet. 234, 489–493 (1992)] egy promoter próbavektor, amely hordoz egy promoter nélküli – *Streptoalloteichus hindustanus*-ból származó – phleomicinrezisztencia-gént. A pUT715 DNS-t EcoRV-tel emésztettük, és az 1250 bp trpC promoterfragmentumhoz ligáltuk. A ligációs keveréket *E. coli* DH5α törzsbe transzformáltuk, és az eredményül kapott plazmidot pUT715/trpC-vel jelöltük.

A pUT715/trpC DNS-t BamHI és BglIII enzimekkel emésztettük. A trpC promotert és a phleomicinrezisztencia-gént tartalmazó 2,4 kb fragmentumot agarózgél-elektroforézist követően izoláltuk. A pWB19N DNS-t hasítottuk BamHI enzimmal, és a 2,4 kb fragmentumhoz ligáltuk. Az eredményül kapott plazmidot pSJC62 jelöléssel láttuk el (9. ábra).

##### 2. A pF023 összeállítása

A pF021 plazmid rendelkezik egy – a *Fusarium oxysporum* 435 törzs genomialis DNS-éből származó – körülbelül 12 kb EcoRI fragmentum-inszertummal. A pF021 DNS-t Sall enzimmal hasítottuk, és újra összekötöttük cirkuláris T4 DNS-ligáz segítségével. Az eredményül kapott pF023 plazmid a pF021-ből a nemkódoló *Fusarium* DNS 5,8 kb deléciójával rendelkezik (5. ábra).

##### 3. A pBMFXPVA6 összeállítása

A pSJC62 DNS-t EcoRI és XbaI enzimekkel hasítottuk. Az eredményül kapott – az *Aspergillus trpC* promotert és a phleomicinrezisztencia-gént tartalmazó –

2,4 kb fragmentumot izoláltuk. A pF023 DNS-t EcoRI és XbaI enzimekkel emésztettük. A DNS-keveréket agarózgélén szeparáltuk. A PVA-gént tartalmazó 7,9 kb fragmentumot izoláltuk, és az *Aspergillus trpC* promotert és a phleomicinrezisztencia-gént tartalmazó 2,4 kb fragmentumhoz ligáltuk. Az eredményül kapott plazmidot pBMFXPVA6 jelöléssel illettük (10. ábra).

##### 4. A pBMFXPVA7 összeállítása

A pBMFXPVA6 DNS-t NcoI és XbaI enzimekkel hasítottuk. A ragados végeket tompa végekké alakítottuk át Klenow-fagmentum segítségével. A DNS-keveréket agarózgélén szeparáltuk, és a PVA-gént tartalmazó 4,3 kb fragmentumot izoláltuk. A pBMFXPVA6 DNS-t XbaI enzimmal hasítottuk és Klenow-fagmentummal kezeltük. A linearizált pBMFXPVA6 DNS-t a 4,3 kb PVA-génfragmentumhoz ligáltuk pBMFXPVA7 plazmidot képezve (11. ábra).

5. PVA-gén-expresszió heterológ gazdaszervezetben, Rekombináns pBMFXPVA6 plazmidot származtattunk pF023-ból (5. ábra) az *Aspergillus nidulans trpC* promoterének szabályozása alatt álló phleomicinrezisztencia-gén betoldásával (10. ábra). Rekombináns pBMFXPVA7 plazmidot származtattunk pBMFXPVA6-ból a PVA-gén második másolatának betoldásával (11. ábra). Ezeket a rekombináns plazmidokat bevittük az ATCC 16322 törzsbe (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) –, amely a PVA-génnek heterológ gazdaszervezete (azaz a *F. oxysporum*-tól eltérő alfaj) – polietilénliglikol közvetítette protoplaszttranszformációval [Powell és Kistler, J. Bacteriol. 172, 3163–3171 (1990)]. A phleomicinrezisztens transzformátumok DNS-analízise megerősítette, hogy a transzformáló DNS-ek beépültek a gazdasajt-kromoszómákba. Ez ideig a *Fusarium oxysporum* 435 törzset nem tudták transzformálni e polietilénliglikol közvetítette protoplaszttranszformációs eljárás alkalmazásával.

A transzformátumokat ezután rázatott lombikokban fermentáltuk, és meghatároztuk a PVA-aktivitást. A *F. oxysporum* 435 törzs 20 NE/ml-t termelt. A nem transzformált ATCC 16322 törzs 1,0 NE/ml-t termelt, a pBMFXPVA6 plazmidot (egy PVA-gént) tartalmazó transzformátumok 10 NE/ml-t és a pBMFXPVA7 plazmidot (két PVA-gént) tartalmazó transzformátumok 130 NE/ml-t termeltek (2. táblázat). Összegezve, a heterológ gazdaszervezetben kifejezett PVA-aktivitás az eredeti *F. oxysporum* 435 törzshöz képest 5-szörösére emelkedett.

2. táblázat

V-penicillin amidohidroláz enzimaktivitása

| Törzsek                                  | Titer rázatott lombikban (NE/ml) |
|------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> 435            | 20                               |
| ATCC 16322                               | 1                                |
| ATCC 16322 (pBMFXPVA6)+<br>(egy PVA-gén) | 10                               |
| ATCC 16322 (pBMFXPVA7)+ (két<br>PVA-gén) | 130                              |

Továbbá a rekombináns PVA kifejeződése ugyanolyan mértékben indukálható fenoxi-acetát jelenlétében, mint a *F. oxysporum* 435 törzsnél (3. táblázat).

### 3. táblázat

A V-penicillin amidohidroláz gén kifejeződésének fenoxi-acetát-indukciója

| Törzs                     | Titer (NE/ml)<br>–fenoxi-acetát | Titer (NE/ml)<br>+fenoxi-acetát | Indukció<br>szintje |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>F. oxysporum</i> 435   | 0,49                            | 21,13                           | 43×                 |
| ATCC 16322<br>(pBMFPVA7)+ | 2,73                            | 135,32                          | 50×                 |

### 5. példa

#### Gomba-expressziósvektorok összeállítása

A PVA-gén kifejeződése indukálható fenoxi-acetát-adagolással. Úgy tűnik, hogy expressziós vektorok kifejleszthetők a PVA – promoternak nevezett – transzkripció és transzláció szabályozó régiójából, idegen génnek *F. oxysporum*-ban történő kifejezéséhez.

A következő összeállításokat az intracelluláris fehérjék kifejezésére szolgáló pBMPVA–P plazmid és a szekretálható fehérjék kifejezésére szolgáló pBMPVA–M plazmid létrehozására használtuk fel.

#### 1. A pF020 összeállítása

A pF023 DNS-t BamHI és XhoI enzimekkel hasítottuk. A DNS-keveréket agarózgélben szeparáltuk. A PVA-gén 5'-végétől upstream elhelyezkedő transzkripció és transzláció szabályozó szekvenciákat tartalmazó 2,1 kb fragmentumot izoláltuk. A pF023 plazmidot is hasítottuk XhoI és HindIII enzimekkel. A PVA-gén második részét tartalmazó 1,5 kb fragmentumot gélen tisztítottuk. Mindkét fragmentumot ligáltuk a pUC19-hez a HindIII és BamHI helyeken. Az eredményül kapott plazmidot pF020-ként jelöltük. A pF020 szerkezetét a 12. ábra mutatja.

#### 2. A pF020–P összeállítása

Morinaga és munkatársaitól származó pontmutációs eljárást [Bio/Technol. 2, 636–639 (1984)] alkalmaztunk a PVA-gén transzlációs starthelyén történő MluI hely létrehozására (a 21. számú szekvencia 241. számú bázispárja).

ATGCGCGTC (24. számú szekvencia)

↓ helyspecifikus mutagenézis

ATACGCGTC (25. számú szekvencia)

MluI hely

A MluI hely létrehozása lehetővé teszi a PVA-gén kódoló régiójának MluI és BamHI enzimes hasítással történő eltávolítását, és helyettesítését egy olyan gén kódoló szekvenciájával, amely a PVA-promoter kontrollja alatt fejeződik ki. Egy 15 tagú mutagén oligonukleotidot (GGCACTATACGCGTC, 26. számú szekvencia) szintetizáltunk.

A pF020–P szerkezetét a 13. ábrán rajzoltuk meg. pF020 2 µg-ját emésztettük XmaI enzimmal, amelyet bakteriális alkalikus foszfáttal (BAP) történő kezelés követett a keletkező I fragmentum önmagával való ligációjának elkerülésére. pF020 2 µg-ját hasítottuk EcoRI

és SphI enzimekkel a mutációs cél régió (például a PVA-gén upstream régiója) eltávolítása céljából. Az eredményül kapott 5 kb fragmentumot (II fragmentumot) gélen tisztítottuk. I és II fragmentumok egyenlő moláris mennyiségeit kevertük a 15 tagú mutagén oligonukleotid 200-szoros moláris feleslegével. A keveréket 100 °C-on 3 percig inkubáltuk a keverékben levő DNS-fragmentumok teljes denaturálása céljából. A denaturáció után a keveréket fokozatosan hűtöttük le lépésről lépésre, lehetővé téve a denaturált DNS-fragmentum újrahajlítását (reannealing). Ez alatt az újrahajlítási eljárás alatt a két eredeti I és II fragmentumon túl két új DNS-species képződött, DNS-a és DNS-b. Ahogyan azt a 13. ábrán bemutatjuk, a 15 tagú mutagén oligonukleotid a két cirkuláris DNS-speciesnek csak egyikével hibridizált a heteroduplexet képezve, mivel az oligonukleotid a cél régió két szála közül csak az egyikkel volt komplementer. A DNS-eket Klenow-fragmentummal, T4 DNS-ligázzal és négy dNTP-vel inkubáltuk. Ez a kezelés a nyitott cirkuláris DNS-t zárt cirkuláris DNS-sé alakította. A reakció után a keveréket *E. coli* DH5α transzformálására használtuk fel. A transzformátumok plazmid DNS-eit MluI hasítással analízissel screeneltük. A pF020–P plazmidot MluI hasítási hely létrejöttével azonosítottuk.

#### 3. A pBMPVA–P összeállítása

Mivel a pF020–P két BamHI hellyel rendelkezik, amely megakadályozza ennek az expressziós vektornak a használatát, a pUC19 vektor régiójából a BamHI helyet el kell távolítani. A pF020–P plazmidot BamHI enzinn korlátozott mennyiségével kezeltük részlegesen hasított állapot létrehozására, és utána EcoRI-gyel hasítottuk. A kiálló 5'-végeket Klenow-fragmentummal töltöttük fel. 6,3 kb fragmentumot tisztítottunk gélen, T4 DNS-ligázzal kapcsoltuk és *E. coli* DH5α törzsbe transzformáltuk. Az eredményül kapott pBMPVA–P plazmid (14. ábra) felhasználható expressziós vektorként a kívánt gén kódoló szekvenciájának beszúrására MluI/BamHI helyeknél a PVA-promoter kontrollja alatt.

#### 4. A pF020–M összeállítása

SmaI helyet hoztunk létre a PVA szekréciós szignálszekvenciája és az érett PVA-fehérje elágazásánál (22. számú szekvencia, 24–25. aminosavak).

AACAAA/GGCAAC (27. számú szekvencia)

N K G N (28. számú szekvencia)

↓ helyspecifikus mutagenézis

AACCCC/GGGAAC (29. számú szekvencia)

SmaI hely

A SmaI helyek létrehozása megengedi egy kódoló szekvencia beszúrását a PVA szekréciós szignálszekvencia után, és így lehetővé teszi majd a kifejeződött fehérje szekrécióját. Egy 28 tagú mutagén oligonukleotidot

(GCAGCTCCCAACCCCGGGAACGATGATT, 30. számú szekvencia) szintetizáltunk.

A pF020–M szerkezetét a 15. ábrán mutattuk meg. Az eljárás hasonló volt a pF020–P összeállításához. A pF020 plazmidot hasítottuk XmaI enzimmal, amelyet BAP kezelés követett az I fragmentum előállítására. A pF020-at ezután SphI és HindIII enzimekkel emésztettük a cél régió eltávolítása céljából, és egy 6 kb

II fragmentum létrehozására. A heteroduplexképzés és a DNS-kiterjesztés körülményei hasonlóak voltak a pF020–P összeállításához. Transzformátumok plazmid DNS-eit screeneltük egy további SmaI hely létrejöttére.

#### 5. A pBMPVA–M összeállítása

A pF020–M plazmid két BamHI és két SmaI hellyel rendelkezik, amely megakadályozza ennek a vektornak a használatát. A fölösleges BamHI és SmaI helyeket a pUC19 régióból el kell távolítani. A pF020–M plazmidot részlegesen hasítottuk BamHI-gyel, és utána EcoRI-  
10 gyel hasítottuk. A ragadós végeket feltöltöttük Klenow-fragmentummal. 6,3 kb fragmentumot tisztítottunk gélen, ligázal kapcsoltuk és *E. coli* DH5 $\alpha$  törzsbe transzformáltuk. Az eredményül kapott pBMPVA–M plazmid (16. ábra) felhasználható szekretálható expressziós vektorként a kívánt gén kódolószekvenciájának beszúrására a SmaI/BamHI helyeknél a PVA promoter kontrollja alatt.

#### 6. példa

A D-aminosav oxidáz gén kifejezése a PVA expressziós vektorokkal

A D-aminosav oxidáz gént – amelyet a *Trigonopsis variabilis*-ből klónoztunk – használtuk a *Fusarium* PVA expressziós vektorokkal kifejezendő idegen gén példaként.

#### 1. A D-aminosav oxidáz gén kifejezése pBMPVA–P-vel

A *Trigonopsis variabilis* D-aminosav oxidáz (DAAO) gént a Bristol-Myers Squibb kutatói klónozták. A DNS-szekvencia analízise jelezte, hogy egy 38 bp intron van a kódolószekvencia 5'-végének közelében. Oligonukleotidra irányított helyspecifikus mutagenézis-módszert alkalmaztunk az intron eltávolítására és NcoI hely létrehozására a DAAO gén transzlációs start-helyén. Ezért a DAAO-t kódoló szekvenciát plusz egy 700 bp 3' nem transzkripció régiót tisztíthatjuk egy 2,1 kb NcoI/BamHI fragmentumaként.

A pBMPVA–P plazmid DNS-t MluI hasítással kezeltük, és a ragadós végeket feltöltöttük a Klenow-fragmentummal. A DNS-t ezután BamHI-gyel hasítottuk. A PVA-promoterrégiót tartalmazó 4,7 kb fragmentumot gélen tisztítottuk. A DAAO génfragmentumot ligáltuk a DAAO gén 2,1 kb NcoI–Klenow/BamHI fragmentumával a pBMPVA–P/DAAO1 plazmid létrehozása céljából. A pBMPVA–P/DAAO1 plazmid NdeI hasításával és Klenow-feltöltésével egy 3,4 kb PVA-promoter/DAAO gén fúziós fragmentumot készítettünk, és gélen tisztítottuk. A fragmentumot pSJC62 DNS-be és a Klenowval feltöltött XbaI helyre inszertáltuk. Az eredményül kapott plazmidot pBMPVA–P/DAAO2 jelzéssel láttuk el. A teljes szerkezeti vázlatot a 17. ábrán mutatjuk be.

A pBMPVA–P/DAAO2 DNS-t ATCC 16322 törzsbe vittük be polietilénlikol közvetítette protoplaszt-transzformációval. A transzformátumokat phleomicinrezisztenciájuk alapján válogattuk ki. Néhány transzformátumot PVA-termelő tápközegben szaporítottunk, és megvizsgáltuk D-aminosav oxidáz-aktivitásukat. Az eredmények azt mutatták, hogy a D-aminosav oxidáz gén

0,2–0,8 NE/ml szinten fejeződött ki az ATCC 16322 transzformátumokban.

#### 2. A D-aminosav oxidáz gén kifejezése pBMPVA–M-mel

A pBMPVA–M plazmid DNS-t SmaI és BamHI enzimekkel hasítottuk. Mind a PVA-promoterrégiót, mind a PVA-t szekréciós szignálszekvenciát tartalmazó 4,8 kb fragmentumot gélen tisztítottuk. A DAAO génfragmentumot NcoI hasítással plusz mungóbabnukleázos kezeléssel preparáltuk az 5' ragadós végek eltávolítására és a DAAO gén helyes olvasási keretének megtartására, és utána BamHI emésztést végeztünk egy 2,1 kb fragment létrehozására. A 4,8 kb PVA promoter/szignál szekvencia fragmentumot a 2,1 kb DAAO génfragmentumhoz ligáltuk pBMPVA–M/DAAO3 plazmid létrehozása céljából. A pBMPVA–M/DAAO3 plazmidot NdeI enzimmel hasítottuk, és az 5' ragadós végeket a Klenow-fragmentummal töltöttük fel. A 3,5 kb PVA promoter/szignál szekvencia/DAAO gén fúziós fragmentumot tisztítottuk, és beszúrtuk a pSJC62 DNS-be a Klenowval feltöltött XbaI helyen. Az eredményül kapott plazmidot pBMPVA–M/DAAO4 jelöléssel láttuk el (18. ábra).

A pBMPVA–M/DAAO4 plazmid DNS-t ATCC 16322 törzsbe transzformáltuk. Néhány phleomicinrezisztens transzformátumot analizáltunk D-aminosav oxidáz-aktivításra. Sajnos egyik transzformátum sem mutatott D-aminosav oxidáz-aktivitást. A D-aminosav oxidáz gén pBMPVA–M vektorral történő kifejeződésének a hibája adódhat a D-aminosav oxidáz enzim intracelluláris természetéből. Széles körben ismert, hogy az intracelluláris fehérjét kódoló gének nem tudnak extracellulárisan kifejeződni és áthelyeződni egy szekréciós expressziós rendszer segítségével [Model és Russel, Cell 61, 739–741 (1990)]. Még ha a gén ki is fejeződik intracellulárisan, a hozzá kapcsolódó PVA-szignálszekvencia inaktíválhatja a D-aminosav oxidázt. Ezért a pBMPVA–M vektor még használható más szekretálható fehérjéjének kifejezésére.

#### SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

##### (1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(iii) A szekvenciák száma: 30

##### (2) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 29 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLASSÁG:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: peptid

(v) FRAGMENTTÍPUS: N-terminális

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) SZERVEZET: *Fusarium oxysporum*

(ix) JELLEGZETESSÉG:

(A) NÉV/KULCS: peptid

(B) HELYZET: 7

(D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:  
„Aminosav 7 Ala vagy Lys lehet”

(ix) JELLEGZETESSÉG:

(A) NÉV/KULCS: peptid

(B) HELYZET: 22

(D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:

„Aminosav 22 Thr vagy Val lehet”

(xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asn | Asp | Asp | Phe | Ala | Xaa | Lys | Xaa | Ala | Ser | Leu | Lys | Lys | Ser | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Lys | Leu | Pro | Gly | Thr | Xaa | Val | Tyr | Phe | Thr | Gln | His | Val |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     |     |

(2) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

10

(A) HOSSZ: 12 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLASSÁG: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: peptid

15

(ix) JELLEGZETESSÉG:

(A) NÉV/KULCS: peptid

(B) HELYZET: 4

(D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:

„Aminosav 4 Ser vagy Pro lehet”

20

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Leu | Asn | Xaa | Ser | Gln | Xaa | Xaa | Gln | Phe | Tyr | Xaa |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

(2) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

25

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 12 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLASSÁG:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Val | Lys | Thr | Gly | Pro | Ala | Xaa | Xaa | Val | Ser | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

(2) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

35

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 10 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLASSÁG:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

40

(xi) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asn | Asp | Asp | Phe | Ala | Ala | Xaa | Xaa | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

(2) AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

45

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 20 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLASSÁG:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

50

(xi) AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Xaa | Xaa | Thr | Ala | Asp | Thr | Asn | Val | Leu | Leu | Ala | Xaa | Val | Lys | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Val | Glu | Glu | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

(2) A 6. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 25 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

60

(C) SZÁLASSÁG:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: peptid

(ix) JELLEGZETESSÉG:

|                                                                       |    |                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------|----|
| (A) NÉV/KULCS: peptid                                                 |    | (A) NÉV/KULCS: peptid                                                 |    |
| (B) HELYZET: 16                                                       |    | (B) HELYZET: 23                                                       |    |
| (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:<br>„Aminosav 16 Asn vagy Ser lehet” |    | (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:<br>„Aminosav 23 Val vagy Ser lehet” |    |
| (ix) JELLEGZETESSÉG:                                                  | 5  | (ix) JELLEGZETESSÉG:                                                  |    |
| (A) NÉV/KULCS: peptid                                                 |    | (A) NÉV/KULCS: peptid                                                 |    |
| (B) HELYZET: 21                                                       |    | (B) HELYZET: 25                                                       |    |
| (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:<br>„Aminosav 21 Asn vagy His lehet” |    | (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: megjegyzés:<br>„Aminosav 25 Thr vagy Arg lehet” |    |
| (ix) JELLEGZETESSÉG:                                                  | 10 |                                                                       |    |
| (xi) A 6. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                   |    |                                                                       |    |
| Ile His Trp Ser Gly Leu Glu Asp Gly Leu Ile Ser Ala Glu Asn Xaa       |    |                                                                       |    |
| 1 5 10 15                                                             |    |                                                                       |    |
| Asp Tyr Tyr Asn Xaa Val Xaa Ser Xaa                                   |    |                                                                       |    |
| 20 25                                                                 |    |                                                                       |    |
| (2) A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: (i)                                 |    | GTNAARTGGG TNGARGARGG                                                 | 20 |
| A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                               |    | (2) A 10. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                    |    |
| (A) HOSSZ: 4 aminosav                                                 |    | (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           |    |
| (B) TÍPUS: aminosav                                                   | 20 | (A) HOSSZ: 20 bázispár                                                |    |
| (C) SZÁLASSÁG:                                                        |    | (B) TÍPUS: nukleinsav                                                 |    |
| (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    | (C) SZÁLASSÁG: egyszálú                                               |    |
| (ii) MOLEKULATÍPUS: peptid                                            |    | (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    |
| (xi) A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                   |    | (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS                                              |    |
| Pro Tyr Asn Asp                                                       | 25 | (xi) A 10. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                  |    |
| (2) A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                     |    | CCYTCYTCNA CCCAYTTNAC                                                 | 20 |
| (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           |    | (2) A 11. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                    |    |
| (A) HOSSZ: 7 aminosav                                                 |    | (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           |    |
| (B) TÍPUS: aminosav                                                   |    | (A) HOSSZ: 20 bázispár                                                |    |
| (C) SZÁLASSÁG:                                                        | 30 | (B) TÍPUS: nukleinsav                                                 |    |
| (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    | (C) SZÁLASSÁG: egyszálú                                               |    |
| (ii) MOLEKULATÍPUS: peptid                                            |    | (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    |
| (xi) A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                   |    | (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS                                              |    |
| Val Lys Trp Val Glu Gly                                               |    | (xi) A 11. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                  |    |
| 1 5                                                                   | 35 | GTYTCYTCNT CGGAYTTNAC                                                 | 20 |
| (2) A 9. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                     |    | (2) A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                    |    |
| (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           |    | (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           |    |
| (A) HOSSZ: 20 bázispár                                                |    | (A) HOSSZ: 10 aminosav                                                |    |
| (B) TÍPUS: nukleinsav                                                 |    | (B) TÍPUS: aminosav                                                   |    |
| (C) SZÁLASSÁG: egyszálú                                               | 40 | (C) SZÁLASSÁG:                                                        |    |
| (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    | (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    |
| (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS                                              |    | (ii) MOLEKULATÍPUS: peptid                                            |    |
| (xi) A 9. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                   |    |                                                                       |    |
| (xi) A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                  |    |                                                                       |    |
| Gly Asn Asp Asp Phe Ala Ala Lys Cys Ala                               |    |                                                                       |    |
| 1 5 10                                                                |    |                                                                       |    |
| (2) A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                    |    | (A) HOSSZ: 23 bázispár                                                |    |
| (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           | 50 | (B) TÍPUS: nukleinsav                                                 |    |
| (A) HOSSZ: 5 aminosav                                                 |    | (C) SZÁLASSÁG: egyszálú                                               |    |
| (B) TÍPUS: aminosav                                                   |    | (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    |
| (C) SZÁLASSÁG:                                                        |    | (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS                                              |    |
| (D) TOPOLOGIA: lineáris                                               |    | (xi) A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                  |    |
| (ii) MOLEKULATÍPUS: peptid                                            | 55 | TTTTTTTTGT AGCGAAATGC GCC                                             | 23 |
| (xi) A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:                                  |    | (2) A 15. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                    |    |
| Val Ala Lys Cys Ala                                                   |    | (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           |    |
| 1 5                                                                   |    | (A) HOSSZ: 23 bázispár                                                |    |
| (2) A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:                                    |    | (B) TÍPUS: nukleinsav                                                 |    |
| (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:                                           | 60 | (C) SZÁLASSÁG: egyszálú                                               |    |

(D) TOPOLOGIA: lineáris  
(ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
(xi) A 15. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:  
TTTTTCTGC AGCGAAATGC GCC 23  
(2) A 16. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: 5  
(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 33 bázispár  
(B) TÍPUS: nukleinsav  
(C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
(D) TOPOLOGIA: lineáris  
(ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS

(xi) A 16. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:  
CCCGGAACG ACGACTTTGC AGCGAAATGC GCC

33

(2) A 17. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:  
(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
(A) HOSSZ: 33 bázispár  
(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
(D) TOPOLOGIA: lineáris  
(ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS

(xi) A 17. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:  
CGCGCATTTTC GCTGCAAAGT CGTCGTTCCC GGG 33

(2) A 18. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:  
(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: 20  
(A) HOSSZ: 1767 bázispár  
(B) TÍPUS: nukleinsav  
(C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
(D) TOPOLOGIA: lineáris

(C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
(D) TOPOLOGIA: lineáris  
(ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
(ix) JELLEGZETESSÉG:  
(A) NÉV/KULCS: cds  
(B) HELYZET: 1...1521

(xi) A 18. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| GGC AAC GAT GAT TTT GCC GCG AAA TGC GCC AGC CTC AAG AAG TCG CTC | 48  |
| Gly Asn Asp Asp Phe Ala Ala Lys Cys Ala Ser Leu Lys Lys Ser Leu |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| AAA CTC CCC GGC ACC ACC GTA TAC TTC ACC CAG CAT GTC TCG GCT GGT | 96  |
| Lys Leu Pro Gly Thr Thr Val Tyr Phe Thr Gln His Val Ser Ala Gly |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| ACC AAC ATC ACT TTC CCC GAT AAT CAC CCG ACC TGC GGT CCT AAC TAT | 144 |
| Thr Asn Ile Thr Phe Pro Asp Asn His Pro Thr Cys Gly Pro Asn Tyr |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| CAG GTT ACG GAC GTT GAG GTC TGC CGC GTG GCC ATG TTA GTC AAG ACG | 192 |
| Gln Val Thr Asp Val Glu Val Cys Arg Val Ala Met Leu Val Lys Thr |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| GGA CCC GCC TCA AAC GTT AGC ATC GAA GCT TGG CTT CCC TTG AAC TGG | 240 |
| Gly Pro Ala Ser Asn Val Ser Ile Glu Ala Trp Leu Pro Leu Asn Trp |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ACA GGT CGG TTC TTA GGA ACT GGC AAT GGT GGA TTA GCT GGC TGT ATG | 288 |
| Thr Gly Arg Phe Leu Gly Thr Gly Asn Gly Gly Leu Ala Gly Cys Met |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| CCC TAC AAC GAT ATG GCG TAC GGC AAC AGT TTC GGC TTC GCC AGC GTT | 336 |
| Pro Tyr Asn Asp Met Ala Tyr Gly Asn Ser Phe Gly Phe Ala Ser Val |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| GGC ACG AAC AAC GGA CAT AAC GGA ACC TCA GGC CTA CCC ATG TAC CGC | 384 |
| Gly Thr Asn Asn Gly His Asn Gly Thr Ser Gly Leu Pro Met Tyr Arg |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| AAC CCA GGC GTG GTT GAG GAC TTT GCC TAT CGT GCG GTG CAC GCT GGT | 432 |
| Asn Pro Gly Val Val Glu Asp Phe Ala Tyr Arg Ala Val His Ala Gly |     |
| 130 135 140                                                     |     |



HU 218 265 B

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| GCT | GTT | ATC | GGA | AAG | AAG | ATC | ACC | CAG | GGC | TTT | TAC | GGC | AAG | AAG | TTC | 480  |
| Ala | Val | Ile | Gly | Lys | Lys | Ile | Thr | Gln | Gly | Phe | Tyr | Gly | Lys | Lys | Phe |      |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |      |
| AAG | TCC | TAC | TTT | CTC | GGC | TGC | TCG | ACA | GGA | GGA | CGT | CAA | GCA | ATG | AAG | 528  |
| Lys | Ser | Tyr | Phe | Leu | Gly | Cys | Ser | Thr | Gly | Gly | Arg | Gln | Ala | Met | Lys |      |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |      |
| TTG | GCA | CAG | AGC | TTC | CCC | GAG | GAT | TAC | GAT | GGC | TAT | GTG | GCA | GGT | GCT | 576  |
| Leu | Ala | Gln | Ser | Phe | Pro | Glu | Asp | Tyr | Asp | Gly | Tyr | Val | Ala | Gly | Ala |      |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |      |
| CCG | GCT | ATG | CGC | TGG | AAC | GGT | CTT | CAG | GCA | CGC | TCT | GGA | AGT | TTC | TGG | 624  |
| Pro | Ala | Met | Arg | Trp | Asn | Gly | Leu | Gln | Ala | Arg | Ser | Gly | Ser | Phe | Trp |      |
|     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |
| GGC | ATC | ACC | GGC | CCC | CCT | GGA | GCT | CCT | GGC | CAT | GTG | ACT | CCA | GAC | GAG | 672  |
| Gly | Ile | Thr | Gly | Pro | Pro | Gly | Ala | Pro | Gly | His | Val | Thr | Pro | Asp | Glu |      |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| TGG | GAA | ATG | GTG | CAC | AAG | AGC | GTC | CTG | ACT | CAG | TGC | GAC | GAG | CCC | ATT | 720  |
| Trp | Glu | Met | Val | His | Lys | Ser | Val | Leu | Thr | Gln | Cys | Asp | Glu | Pro | Ile |      |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| GAT | GGC | GTC | GAT | GAC | GGC | GTG | CTT | GAG | GAC | CCC | ACC | CTC | TGT | CAG | TAC | 768  |
| Asp | Gly | Val | Asp | Asp | Gly | Val | Leu | Glu | Asp | Pro | Thr | Leu | Cys | Gln | Tyr |      |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| CGC | CCT | GAG | GCT | CTC | ATC | TGC | GGT | AAG | GGC | CAG | ACC | GAG | AAT | TGC | CTG | 816  |
| Arg | Pro | Glu | Ala | leu | Ile | Cys | Gly | Lys | Gly | Gln | Thr | Glu | Asn | Cys | Leu |      |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| ACC | AAG | GCC | AAG | ATT | GAG | ACG | GTC | CGC | AAA | GTC | TTT | TCT | CCC | CTA | TAC | 864  |
| Thr | Lys | Ala | Lys | Ile | Glu | Thr | Val | Arg | Lys | Val | Phe | Ser | Pro | Leu | Tyr |      |
|     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| ACC | ACG | AAT | GAG | ACA | TAC | GTC | TAC | CCT | CGA | GCG | GTT | CCT | GGT | GCT | AAC | 912  |
| Thr | Thr | Asn | Glu | Thr | Tyr | Val | Tyr | Pro | Arg | Ala | Val | Pro | Gly | Ala | Asn |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| GCT | CTC | TTT | AAC | TTT | GTT | GTC | GCC | GAG | ACA | CCA | TTC | GTT | TAC | TCC | ACA | 960  |
| Ala | Leu | Phe | Asn | Phe | Val | Val | Ala | Glu | Thr | Pro | Phe | Val | Tyr | Ser | Thr |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| GAA | TGG | TAC | CAG | TAT | GTC | ATC | TGG | GAA | GAC | CCT | GAG | TGG | AAT | CCT | GAC | 1008 |
| Glu | Trp | Tyr | Gln | Tyr | Val | Ile | Trp | Glu | Asp | Pro | Glu | Trp | Asn | Pro | Asp |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| ACT | ATT | GGG | CCC | AAG | GAC | TAT | GAT | AGA | GGT | GCC | GAG | ATG | AAC | CCC | TAT | 1056 |
| Thr | Ile | Gly | Pro | Lys | Asp | Tyr | Asp | Arg | Gly | Ala | Glu | Met | Asn | Pro | Tyr |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| GAC | ATT | GAG | ACT | TGG | GAG | GGA | GAC | CTG | TCT | AAG | TTC | CGC | AAG | CGT | GGC | 1104 |
| Asp | Ile | Glu | Thr | Trp | Glu | Gly | Asp | Leu | Ser | Lys | Phe | Arg | Lys | Arg | Gly |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| AAC | AAG | ATG | ATT | CAC | TGG | CAC | GGC | CTT | CAG | GAC | GGA | CTC | ATC | AGC | GCC | 1152 |
| Asn | Lys | Met | Ile | His | Trp | His | Gly | Leu | Gln | Asp | Gly | Leu | Ile | Ser | Ala |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |      |
| GAG | AAC | TCA | GAC | GAT | TAT | TAT | AAT | CAC | GTG | TCT | CGA | ACA | ATG | GGC | CTC | 1200 |

|            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Glu        | Asn        | Ser        | Asp        | Asp        | Tyr | Tyr | Asn | His | Val | Ser | Arg        | Thr | Met | Gly | Leu |      |
| 385        |            |            |            |            | 390 |     |     |     |     | 395 |            |     |     |     | 400 |      |
| AAT        | AGT        | AGC        | CAG        | CTG        | GAC | CAG | TTT | TAT | AGG | TTC | TTC        | CGC | GTC | AGT | GGG | 1248 |
| Asn        | Ser        | Ser        | Gln        | Leu        | Asp | Gln | Phe | Tyr | Arg | Phe | Phe        | Arg | Val | Ser | Gly |      |
|            |            |            |            | 405        |     |     |     |     | 410 |     |            |     |     | 415 |     |      |
| TGT        | GGC        | CAT        | TGC        | AGC        | GCC | GGA | GAC | GGG | GCT | TCT | CGC        | ATT | GGA | AAC | AAC | 1296 |
| Cys        | Gly        | His        | Cys        | Ser        | Ala | Gly | Asp | Gly | Ala | Ser | Arg        | Ile | Gly | Asn | Asn |      |
|            |            |            | 420        |            |     |     |     | 425 |     |     |            |     | 430 |     |     |      |
| GCC        | GGA        | AAC        | ATG        | GGC        | GGC | AAG | ACG | GCA | GAT | ACT | AAT        | GTG | CTT | CTG | GCT | 1344 |
| Ala        | Gly        | Asn        | Met        | Gly        | Gly | Lys | Thr | Ala | Asp | Thr | Asn        | Val | Leu | Leu | Ala |      |
|            |            | 435        |            |            |     |     |     | 440 |     |     |            |     | 445 |     |     |      |
| ATT        | GTG        | AAA        | TGG        | GTC        | GAG | GAA | GGC | GTT | GCG | CCA | GAA        | ACG | ATT | GGG | GGC | 1392 |
| Ile        | Val        | Lys        | Trp        | Val        | Glu | Glu | Gly | Val | Ala | Pro | Glu        | Thr | Ile | Gly | Gly |      |
|            | 450        |            |            |            |     | 455 |     |     |     |     | 460        |     |     |     |     |      |
| TAC        | AAG        | AAC        | GTC        | GGC        | GGA | ACT | GCA | GAT | GGC | GCT | TTT        | GAC | TAT | GAG | CGT | 1440 |
| Tyr        | Lys        | Asn        | Val        | Gly        | Gly | Thr | Ala | Asp | Gly | Ala | Phe        | Asp | Tyr | Glu | Arg |      |
|            | 465        |            |            |            | 470 |     |     |     | 475 |     |            |     |     |     | 480 |      |
| AGG        | CAT        | TGC        | CGA        | TAC        | CCA | CAC | CGC | AAT | GTC | TGG | GAC        | GGG | AAG | GGG | AAT | 1448 |
| Arg        | His        | Cys        | Arg        | Tyr        | Pro | His | Arg | Asn | Val | Trp | Asp        | Gly | Lys | Gly | Asn |      |
|            |            |            | 485        |            |     |     |     | 490 |     |     |            |     | 495 |     |     |      |
| GTG        | AAG        | GAT        | CCC        | GAT        | AGC | TGG | AAC | TGT | AAG | ATG | TGAGGTGTGG |     |     |     |     | 1531 |
| Val        | Lys        | Asp        | Pro        | Asp        | Ser | Trp | Asn | Cys | Lys | Ile |            |     |     |     |     |      |
|            |            |            | 500        |            |     |     |     | 505 |     |     |            |     |     |     |     |      |
| CCCTAGGCTT | TTGTGGCTGT | CGTTAGGTGG | CATACGTATA | TAAGAGGATC |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     | 1581 |
| ACTGTGAACA | TGCTTTATGT | TGTGCAAGAA | TTGATTGAGA | ATCAGATTGA |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     | 1631 |
| GCTTGCAGAG | CCAAGGCAAA | TAGACCCAAC | TGTTGACGAG | ATCTTGCCCG |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     | 1681 |
| AAGGTAGAGG | CAACGGGGAG | AGAGACCATG | GAAGACAAGG | CGTAGAAAAT |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     | 1731 |
| GGCCGGGGAA | GACGGAAAAA | AAAAACCCCC | CCCCCC     |            |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     | 1767 |

(2) A 19. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(B) TÍPUS: aminosav

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(A) HOSSZ: 507 aminosav

(ii) MOLEKULATÍPUS: fehérje

(xi) A 19. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gly | Asn | Asp | Asp | Phe | Ala | Ala | Lys | Cys | Ala | Ser | Leu | Lys | Lys | Ser | Leu |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Lys | Leu | Pro | Gly | Thr | Thr | Val | Tyr | Phe | Thr | Gln | His | Val | Ser | Ala | Gly |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Thr | Asn | Ile | Thr | Phe | Pro | Asp | Asn | His | Pro | Thr | Cys | Gly | Pro | Asn | Tyr |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Gln | Val | Thr | Asp | Val | Glu | Val | Cys | Arg | Val | Ala | Met | Leu | Val | Lys | Thr |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Gly | Pro | Ala | Ser | Asn | Val | Ser | Ile | Glu | Ala | Trp | Leu | Pro | Leu | Asn | Trp |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |

Thr Gly Arg Phe Leu Gly Thr Gly Asn Gly Gly Leu Ala Gly Cys Met  
 85 90 95  
 Pro Tyr Asn Asp Met Ala Tyr Gly Asn Ser Phe Gly Phe Ala Ser Val  
 100 105 110  
 Gly Thr Asn Asn Gly His Asn Gly Thr Ser Gly Leu Pro Met Tyr Arg  
 115 120 125  
 Asn Pro Gly Val Val Glu Asp Phe Ala Tyr Arg Ala Val His Ala Gly  
 130 135 140  
 Ala Val Ile Gly Lys Lys Ile Thr Gln Gly Phe Tyr Gly Lys Lys Phe  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Tyr Phe Leu Gly Cys Ser Thr Gly Gly Arg Gln Ala Met Lys  
 165 170 175  
 Leu Ala Gln Ser Phe Pro Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Val Ala Gly Ala  
 180 185 190  
 Pro Ala Met Arg Trp Asn Gly Leu Gln Ala Arg Ser Gly Ser Phe Trp  
 195 200 205  
 Gly Ile Thr Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly His Val Thr Pro Asp Glu  
 210 215 220  
 Trp Glu Met Val His Lys Ser Val Leu Thr Gln Cys Asp Glu Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Gly Val Asp Asp Gly Val Leu Glu Asp Pro Thr Leu Cys Gln Tyr  
 245 250 255  
 Arg Pro Glu Ala Leu Ile Cys Gly Lys Gly Gln Thr Glu Asn Cys Leu  
 260 265 270  
 Thr Lys Ala Lys Ile Glu Thr Val Arg Lys Val Phe Ser Pro Leu Tyr  
 275 280 285  
 Thr Thr Asn Glu Thr Tyr Val Tyr Pro Arg Ala Val Pro Gly Ala Asn  
 290 291 300  
 Ala Leu Phe Asn Phe Val Val Ala Glu Thr Pro Phe Val Tyr Ser Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Trp Tyr Gln Tyr Val Ile Trp Glu Asp Pro Glu Trp Asn Pro Asp  
 325 330 335  
 Thr Ile Gly Pro Lys Asp Tyr Asp Arg Gly Ala Glu Met Asn Pro Tyr  
 340 345 350  
 Asp Ile Glu Thr Trp Glu Gly Asp Leu Ser Lys Phe Arg Lys Arg Gly  
 355 360 365  
 Asn Lys Met Ile His Trp His Gly Leu Gln Asp Gly Leu Ile Ser Ala  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Asp Asp Tyr Tyr Asn His Val Ser Arg Thr Met Gly Leu  
 385 390 395 400

Asn Lys Met Ile His Trp His Gly Leu Gln Asp Gly Leu Ile Ser Ala  
 370 375 380  
 Glu Asn Ser Asp Asp Tyr Tyr Asn His Val Ser Arg Thr Met Gly Leu  
 385 390 395 400  
 Asn Ser Ser Gln Leu Asp Gln Phe Tyr Arg Phe Phe Arg Val Ser Gly  
 405 410 415  
 Cys Gly His Cys Ser Ala Gly Asp Gly Ala Ser Arg Ile Gly Asn Asn  
 420 425 430  
 Ala Gly Asn Met Gly Gly Lys Thr Ala Asp Thr Asn Val Leu Leu Ala  
 435 440 445  
 Ile Val Lys Trp Val Glu Glu Gly Val Ala Pro Glu Thr Ile Gly Gly  
 450 455 460  
 Tyr Lys Asn Val Gly Gly Thr Ala Asp Gly Ala Phe Asp Tyr Glu Arg  
 465 470 475 480  
 Arg His Cys Arg Tyr Pro His Arg Asn Val Trp Asp Gly Lys Gly Asn  
 485 490 495  
 Val Lys Asp Pro Asp Ser Trp Asn Cys Lys Ile  
 500 505

## (2) A 20. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 20 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLASSÁG: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

## (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS

## (xi) A 20. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGAAATGGG TCGAGGAAGG

## (2) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

## (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 2289 bázispár

(B) TÍPUS: nukleinsav

(C) SZÁLASSÁG: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

## (ii) MOLEKULATÍPUS: genomiális DNS

## (xi) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AGGTGTCATA CGCGTGTACC GAGGTATCAC CTCCTTTCTT GGACTATTGG 50  
 TTGGTTGTTC TATGAAGGAC CATCCGTTCA CCCCAGGACCA ACCAGGACA 100  
 TCTATGGCAA GAGTTTATCC CGAGGCATGT ATATAATAAA GCTCTTGCCT 150  
 CTCCTTCTCC TGCACCTTCT CAGCCAGGCT CAGGAGGCTG GCAGTGAGTT 200  
 GAATATCTAT CTGTCTGATA GTTGTTTCGTC ATCAGGCACT 240  
 ATG CGC GTC AAC TTC TCG ACC CTG CTG CTT CCC AGC CTC CTC CAA GGG 288  
 Met Arg Val Asn Phe Ser Thr Leu Leu Leu Pro Ser Leu Leu Gln Gly  
 510 515 520  
 CTA GGT GCA TGC GCA GCT CCC AAC AAA GGC AAC GAT GAT TTT GCC GCG 336  
 Leu Gly Ala Cys Ala Ala Pro Asn Lys Gly Asn Asp Asp Phe Ala Ala  
 525 530 535  
 AAA TGC GCC AGC CTC AAG AAG TCG CTC AAA CTC CCC GGC ACC ACC GTA 384  
 Lys Cys Ala Ser Leu Lys Lys Ser Leu Lys Leu Pro Gly Thr Thr Val  
 540 545 550 555  
 TAC TTC ACC CAG CAT GTC TCG GCT GGT ACC AAC ATC ACT TTC CCC GAT 432  
 Tyr Phe Thr Gln His Val Ser Ala Gly Thr Asn Ile Thr Phe Pro Asp  
 560 565 570

HU 218 265 B

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| AAT | CAC | CCG | ACC | TGC | GGT | CCT | AAC | TAT | CAG | GTT | ACG | GAC | GTT | GAG | GTC | 480  |
| Asn | His | Pro | Thr | Cys | Gly | Pro | Asn | Tyr | Gln | Val | Thr | Asp | Val | Glu | Val |      |
|     |     |     | 575 |     |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |      |
| TGC | CGC | GTG | GCC | ATG | TTA | GTC | AAG | ACG | GGA | CCC | GCC | TCA | AAC | GTT | AGC | 528  |
| Cys | Arg | Val | Ala | Met | Leu | Val | Lys | Thr | Gly | Pro | Ala | Ser | Asn | Val | Ser |      |
|     |     | 590 |     |     |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |      |
| ATC | GAA | GCT | TGG | CTT | CCC | TTG | AAC | TGG | ACA | GGT | CGG | TTC | TTA | GGA | ACT | 624  |
| Ile | Glu | Ala | Trp | Leu | Pro | Leu | Asn | Trp | Thr | Gly | Arg | Phe | Leu | Gly | Thr |      |
|     | 605 |     |     |     |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     |      |
| GGC | AAC | AGT | TTC | GGC | TTC | GCC | AGC | GTT | GGC | ACG | AAC | AAC | GGA | CAT | AAC | 672  |
| Gly | Asn | Ser | Phe | Gly | Phe | Ala | Ser | Val | Gly | Thr | Asn | Asn | Gly | His | Asn |      |
|     |     |     |     | 640 |     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |      |
| GGA | ACC | TCA | GGC | CTA | CCC | ATG | TAC | CGC | AAC | CCA | GGC | GTG | GTT | GAG | GAC | 720  |
| Gly | Thr | Ser | Gly | Leu | Pro | Met | Tyr | Arg | Asn | Pro | Gly | Val | Val | Glu | Asp |      |
|     |     |     | 655 |     |     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |      |
| TTT | GCC | TAT | CGT | GCG | GTG | CAC | GCT | GGT | GCT | GTT | ATC | GGA | AAG | AAG | ATC | 768  |
| Phe | Ala | Tyr | Arg | Ala | Val | His | Ala | Gly | Ala | Val | Ile | Gly | Lys | Lys | Ile |      |
|     |     | 670 |     |     |     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |      |
| ACC | CAG | GGC | TTT | TAC | GGC | AAG | AAG | TTC | AAG | TCC | TAC | TTT | CTC | GGC | TGC | 816  |
| Thr | Gln | Gly | Phe | Tyr | Gly | Lys | Lys | Phe | Lys | Ser | Tyr | Phe | Leu | Gly | Cys |      |
|     |     | 685 |     |     |     |     | 690 |     |     |     | 695 |     |     |     |     |      |
| TCG | ACA | GGA | GGA | CGT | CAA | GCA | ATG | AAG | TTG | GCA | CAG | AGC | TTC | CCC | GAG | 864  |
| Ser | Thr | Gly | Gly | Arg | Gln | Ala | met | Lys | Leu | Ala | Gln | Ser | Phe | Pro | Glu |      |
|     |     | 700 |     |     |     | 705 |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |      |
| GAT | TAC | GAT | GGC | TAT | GTG | GCA | GGT | GCT | CCG | GCT | ATG | CGC | TGG | AAC | GGT | 912  |
| Asp | Tyr | Asp | Gly | Tyr | Val | Ala | Gly | Ala | Pro | Ala | Met | Arg | Trp | Asn | Gly |      |
|     |     |     |     | 720 |     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |      |
| CTT | CAG | GCA | CGC | TCT | GGA | AGT | TTC | TGG | GGC | ATC | ACC | GGC | CCC | CCT | GGA | 960  |
| Leu | Gln | Ala | Arg | Ser | Gly | Ser | Phe | Trp | Gly | Ile | Thr | Gly | Pro | Pro | Gly |      |
|     |     |     | 735 |     |     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |      |
| GCT | CCT | GGC | CAT | GTG | ACT | CCA | GAC | GAG | TGG | GAA | ATG | GTG | CAC | AAG | AGC | 1008 |
| Ala | Pro | Gly | His | Val | Thr | Pro | Asp | Glu | Trp | Glu | Met | Val | His | Lys | Ser |      |
|     |     | 750 |     |     |     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |      |
| GTC | CTG | ACT | CAG | TGC | GAC | GAG | CCC | ATT | GAT | GGC | GTC | GAT | GAC | GGC | GTG | 1056 |
| Val | Leu | Thr | Gln | Cys | Asp | Glu | Pro | Ile | Asp | Gly | Val | Asp | Asp | Gly | Val |      |
|     |     | 765 |     |     |     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     |      |
| CTT | GAG | GAC | CCC | ACC | CTC | TGT | CAG | TAC | CGC | CCT | GAG | GCT | CTC | ATC | TGC | 1104 |
| Leu | Glu | Asp | pro | Thr | Leu | Cys | Gln | Tyr | Arg | Pro | Glu | Ala | Leu | Ile | Cys |      |
|     |     |     |     |     | 780 |     | 785 |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |      |
| GGT | AAG | GGC | CAG | ACC | GAG | AAT | TGC | CTG | ACC | AAG | GCC | AAG | ATT | GAG | ACG | 1152 |
| Gly | Lys | Gly | Gln | Thr | Glu | Asn | Cys | Leu | Thr | Lys | Ala | Lys | Ile | Glu | Thr |      |
|     |     |     |     | 800 |     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |      |
| GTC | CGC | AAA | GTC | TTT | TCT | CCC | CTA | TAC | ACC | ACG | AAT | GAG | ACA | TAC | GTC | 1200 |
| Val | Arg | Lys | Val | Phe | Ser | Pro | Leu | Tyr | Thr | Thr | Asn | Glu | Thr | Tyr | Val |      |
|     |     |     | 815 |     |     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |      |
| TAC | CCT | CGA | GCG | GTT | CCT | GGT | GCT | AAC | GCT | CTC | TTT | AAC | TTT | GTT | GTC | 1248 |
| Tyr | Pro | Arg | Ala | Val | Pro | Gly | Ala | Asn | Ala | Leu | Phe | Asn | Phe | Val | Val |      |
|     |     | 830 |     |     |     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |      |

|            |            |            |             |            |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     |      |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| GCC        | GAG        | ACA        | CCA         | TTC        | GTT        | TAC        | TCC        | ACA | GAA | TGG  | TAC | CAG  | TAT | GTC  | ATC | 1296 |
| Ala        | Glu        | Thr        | Pro         | Phe        | Val        | Tyr        | Ser        | Thr | Glu | Trp  | Tyr | Gln  | Tyr | Val  | Ile |      |
|            | 845        |            |             |            |            | 850        |            |     |     |      | 855 |      |     |      |     |      |
| TGG        | GAA        | GAC        | CCT         | GAG        | TGG        | AAT        | CCT        | GAC | ACT | ATT  | GGG | CCC  | AAG | GAC  | TAT | 1344 |
| Trp        | Glu        | Asp        | Pro         | Glu        | Trp        | Asn        | Pro        | Asp | Thr | Ile  | Gly | Pro  | Lys | Asp  | Tyr |      |
|            | 860        |            |             |            | 865        |            |            |     |     | 870  |     |      |     |      | 875 |      |
| GAT        | AGA        | GGT        | GCC         | GAG        | ATG        | AAC        | CCC        | TAT | GAC | ATT  | GAG | ACT  | TGG | GAG  | GGA | 1392 |
| Asp        | Arg        | Gly        | Ala         | Glu        | Met        | Asn        | Pro        | Tyr | Asp | Ile  | Glu | Thr  | Trp | Glu  | Gly |      |
|            |            |            |             | 880        |            |            |            |     | 885 |      |     |      |     | 890  |     |      |
| GAC        | CTG        | TCT        | AAG         | TTC        | CGC        | AAG        | CGT        | GGC | AAC | AAG  | ATG | ATT  | CAC | TGG  | CAC | 1440 |
| Asp        | Leu        | Ser        | Lys         | Phe        | Arg        | Lys        | Arg        | Gly | Asn | Lys  | Met | Ile  | His | Trp  | His |      |
|            |            |            | 895         |            |            |            |            | 900 |     |      |     |      | 905 |      |     |      |
| GGC        | CTT        | CAG        | GAC         | GGA        | CTC        | ATC        | AGC        | GCC | GAG | AAC  | TCA | GAC  | GAT | TAT  | TAT | 1488 |
| Gly        | Leu        | Gln        | Asp         | Gly        | Leu        | Ile        | Ser        | Ala | Glu | Asn  | Ser | Asp  | Asp | Tyr  | Tyr |      |
|            |            | 910        |             |            |            |            | 915        |     |     |      |     | 920  |     |      |     |      |
| AAT        | CAC        | GTG        | TCT         | CGA        | ACA        | ATG        | GGC        | CTC | AAT | AGT  | AGC | CAG  | CTG | GAC  | CAG | 1536 |
| Asn        | His        | Val        | Ser         | Arg        | Thr        | Met        | Gly        | Leu | Asn | Ser  | Ser | Gln  | Leu | Asp  | Gln |      |
|            | 925        |            |             |            |            | 930        |            |     |     |      | 935 |      |     |      |     |      |
| TTT        | TAT        | AGG        | TTC         | TTC        | CGC        | GTC        | AGT        | GGG | TGT | GGC  | CAT | TGC  | AGC | GCC  | GGA | 1584 |
| Phe        | Tyr        | Arg        | Phe         | Phe        | Arg        | Val        | Ser        | Gly | Cys | Gly  | His | Cys  | Ser | Ala  | Gly |      |
|            | 940        |            |             |            | 945        |            |            |     |     | 950  |     |      |     |      | 955 |      |
| GAC        | GGG        | GCT        | TCT         | CGC        | ATT        | GGA        | AAC        | AAC | GCC | GGA  | AAC | ATG  | GGC | GGC  | AAG | 1632 |
| Asp        | Gly        | Ala        | Ser         | Arg        | Ile        | Gly        | Asn        | Asn | Ala | Gly  | Asn | Met  | Gly | Gly  | Lys |      |
|            |            |            |             | 960        |            |            |            |     | 965 |      |     |      |     | 970  |     |      |
| ACG        | GCA        | GAT        | ACT         | AAT        | GTG        | CTT        | CTG        | GCT | ATT | GTG  | AAA | TGG  | GTC | GAG  | GAA | 1680 |
| Thr        | Ala        | Asp        | Thr         | Asn        | Val        | Leu        | Leu        | Ala | Ile | Val  | Lys | Trp  | Val | Glu  | Glu |      |
|            |            |            | 975         |            |            |            |            | 980 |     |      |     |      | 985 |      |     |      |
| GGC        | GTT        | GCG        | CCA         | GAA        | ACG        | ATT        | GGG        | GGC | TAC | AAG  | AAC | GTC  | GGC | GGA  | ACT | 1728 |
| Gly        | Val        | Ala        | Pro         | Glu        | Thr        | Ile        | Gly        | Gly | Tyr | Lys  | Asn | Val  | Gly | Gly  | Thr |      |
|            |            | 990        |             |            |            |            | 995        |     |     |      |     | 1000 |     |      |     |      |
| GCA        | GAT        | GGC        | GCT         | TTT        | GAC        | TAT        | GAG        | CGT | AGG | CAT  | TGC | CGA  | TAC | CCA  | CAC | 1776 |
| Ala        | Asp        | Gly        | Ala         | Phe        | Asp        | Tyr        | Glu        | Arg | Arg | His  | Cys | Arg  | Tyr | Pro  | His |      |
|            | 1005       |            |             |            |            | 1010       |            |     |     | 1015 |     |      |     |      |     |      |
| CGC        | AAT        | GTC        | TGG         | GAC        | GGG        | AAG        | GGG        | AAT | GTG | AAG  | GAT | CCC  | GAT | AGC  | TGG | 1824 |
| Arg        | Asn        | Val        | Trp         | Asp        | Gly        | Lys        | Gly        | Asn | Val | Lys  | Asp | Pro  | Asp | Ser  | Trp |      |
|            | 1020       |            |             |            | 1025       |            |            |     |     | 1030 |     |      |     | 1035 |     |      |
| AAC        | TGT        | AAG        | ATC         | TGAGGTGTGG | CCCTAGGCTT | TTGTGGCTGT | CGTTAGGTGG |     |     |      |     |      |     |      |     | 1876 |
| Asn        | Cys        | Lys        | Ile         |            |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     |      |
| CATACGTATA | TAAGAGGATC | ACTGTGAACA | TGCTTTATGT  | TGTGCAAGAA |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     | 1926 |
| TTGATTGAGA | ATCAGATTGA | GCTTGCAGAG | CCAAGGCCAAA | TAGACCCAAC |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     | 1976 |
| TGTTGACGAG | ATCTTGCCCG | AAGGTAGAGG | CAACGGGGAG  | AGAGACCATG |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     | 2026 |
| GAAGACAAGG | CGTAGAAAAT | GGCCGGGGAA | GACGGGCTGT  | CGGCGATGGA |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     | 2076 |
| GTAGCAACAG | CTGTCACTGG | TGGTCAATGA | CTACACTTCT  | GAGCGGCGAG |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     | 2126 |
| AGATTATAGG | GACCGCACAC | AGGCCATCAT | TTCCCGATAA  | CTAATGGAGA |            |            |            |     |     |      |     |      |     |      |     | 2176 |

CGCAATGGAG CGATGTTTAA ATGCGACAAG ACTGCCATCA TCTAGGTACT 2226  
 TCATGCGTCG CTAAACGCAC CAATGCTGCG CTGCTCATGA TTGTAAACTT 2276  
 AGTTTATA 2284

(2) A 22. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 532 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) MOLEKULATÍPUS: fehérje

(xi) A 22. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Arg Val Asn Phe Ser Thr Leu Leu Leu Pro Ser Leu Leu Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ala Cys Ala Ala Pro Asn Lys Gly Asn Asp Asp Phe Ala Ala  
 20 25 30  
 Lys Cys Ala Ser Leu Lys Lys Ser Leu Lys Leu Pro Gly Thr Thr Val  
 35 40 45  
 Tyr Phe Thr Gln His Val Ser Ala Gly Thr Asn Ile Thr Phe Pro Asp  
 50 55 60  
 Asn His Pro Thr Cys Gly Pro Asn Tyr Gln Val Thr Asp Val Glu Val  
 65 70 75 80  
 Cys Arg Val Ala Met Leu Val Lys Thr Gly Pro Ala Ser Asn Val Ser  
 85 90 95  
 Ile Glu Ala Trp Leu Pro Leu Asn Trp Thr Gly Arg Phe Leu Gly Thr  
 100 105 110  
 Gly Asn Gly Gly Leu Ala Gly Cys Met Pro Tyr Asn Asp Met Ala Tyr  
 115 120 125  
 Gly Asn Ser Phe Gly Phe Ala Ser Val Gly Thr Asn Asn Gly His Asn  
 130 135 140  
 Gly Thr Ser Gly Leu Pro Met Tyr Arg Asn Pro Gly Val Val Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Phe Ala Tyr Arg Ala Val His Ala Gly Ala Val Ile Gly Lys Lys Ile  
 165 170 175  
 Thr Gln Gly Phe Tyr Gly Lys Lys Phe Lys Ser Tyr Phe Leu Gly Cys  
 180 185 190  
 Ser Thr Gly Gly Arg Gln Ala Met Lys Leu Ala Gln Ser Phe Pro Glu  
 195 200 205  
 Asp Tyr Asp Gly Tyr Val Ala Gly Ala Pro Ala Met Arg Trp Asn Gly  
 210 215 220  
 Leu Gln Ala Arg Ser Gly Ser Phe Trp Gly Ile Thr Gly Pro Pro Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Gly His Val Thr Pro Asp Glu Trp Glu Met Val His Lys Ser  
 245 250 255  
 Val Leu Thr Gln Cys Asp Glu Pro Ile Asp Gly Val Asp Asp Gly Val  
 260 265 270

Leu Glu Asp Pro Thr Leu Cys Gln Tyr Arg Pro Glu Ala Leu Ile Cys  
 275 280 285  
 Gly Lys Gly Gln Thr Glu Asn Cys Leu Thr Lys Ala Lys Ile Glu Thr  
 290 295 300  
 Val Arg Lys Val Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Thr Asn Glu Thr Tyr Val  
 305 310 315 320  
 Tyr Pro Arg Ala Val Pro Gly Ala Asn Ala Leu Phe Asn Phe Val Val  
 325 330 335  
 Ala Glu Thr Pro Phe Val Tyr Ser Thr Glu Trp Tyr Gln Tyr Val Ile  
 340 345 350  
 Trp Glu Asp Pro Glu Trp Asn Pro Asp Thr Ile Gly Pro Lys Asp Tyr  
 355 360 365  
 Asp Arg Gly Ala Glu Met Asn Pro Tyr Asp Ile Glu Thr Trp Glu Gly  
 370 375 380  
 Asp Leu Ser Lys Phe Arg Lys Arg Gly Asn Lys Met Ile His Trp His  
 385 390 395 400  
 Gly Leu Gln Asp Gly Leu Ile Ser Ala Glu Asn Ser Asp Asp Tyr Tyr  
 405 410 415  
 Asn His Val Ser Arg Thr Met Gly Leu Asn Ser Ser Gln Leu Asp Gln  
 420 425 430  
 Phe Tyr Arg Phe Phe Arg Val Ser Gly Cys Gly His Cys Ser Ala Gly  
 435 440 445  
 Asp Gly Ala Ser Arg Ile Gly Asn Asn Ala Gly Asn Met Gly Gly Lys  
 450 455 460  
 Thr Ala Asp Thr Asn Val Leu Leu Ala Ile Val Lys Trp Val Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Gly Val Ala Pro Glu Thr Ile Gly Gly Tyr Lys Asn Val Gly Gly Thr  
 485 490 495  
 Ala Asp Gly Ala Phe Asp Tyr Glu Arg Arg His Cys Arg Tyr Pro His  
 500 505 510  
 Arg Asn Val Trp Asp Gly Lys Gly Asn Val Lys Asp Pro Asp Ser Trp  
 515 520 525  
 Asn Cys Lys Ile  
 530

(2) A 23. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

50

(C) SZÁLASSÁG: kettős szálú

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(A) HOSSZ: 240 bázispár

(ii) MOLEKULATÍPUS: genomiális DNS

(B) TÍPUS: nukleinsav

(xi) A 23. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| AGGTGTCATA CGCGTGACC GAGGTATCAC CTCCTTTCTT GGACTATTGG   | 50  |
| TTGGTTGTTC TATGAAGGAC CATCCGTTCA CCCCAGGACGA ACCAGGGACA | 100 |
| TCTATGGCAA GAGTTTATCC CGAGGCATGT ATATAATAAA GCTCTTGCCCT | 150 |



CTCCTTCTCC TGACACTTCT CAGCCAGGCT CAGGAGGCTG GCAGTGAGTT 200

GAATATCTAT CTGTCTGATA GTTGTTCGTC ATCAGGCACT 240

- (2) A 24. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI: 5  
 (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 9 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleinsav  
 (C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
 (xi) A 24. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATGCGCGTC

- (2) A 25. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 9 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleinsav  
 (C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
 (xi) A 25. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATACGCGTC

- (2) A 26. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 12 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleinsav  
 (C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
 (xi) A 26. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGCACTATAC GCGTC

- (2) A 27. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 12 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleinsav  
 (C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
 (xi) A 27. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AACAAAGGCA AC

- (2) A 28. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 4 aminosav  
 (B) TÍPUS: aminosav  
 (C) SZÁLASSÁG:  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: peptid  
 (xi) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Lys Gly Asn

- (2) A 29. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 (A) HOSSZ: 12 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleinsav  
 (C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
 (xi) A 29. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AACCCCGGGA AC

- (2) A 30. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 28 bázispár  
 (B) TÍPUS: nukleinsav  
 (C) SZÁLASSÁG: egyszálú  
 (D) TOPOLOGIA: lineáris  
 (ii) MOLEKULATÍPUS: cDNS  
 (xi) A 30. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:  
 GCAGCTCCCA ACCCCGGGAA CGATGATT

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

15

1. Izolált nukleinsavmolekula, amely a 19. vagy 22. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával rendelkezik.

20

2. Izolált nukleinsavmolekula, amely a 19. vagy 22. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával komplementer szekvenciával rendelkezik.

25

3. Izolált nukleinsavmolekula, amely a 19. vagy 22. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával komplementer szekvenciával rendelkező nukleinsavval hibridizálni képes szekvenciával rendelkezik.

30

4. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, amely DNS-molekula.

30

5. A 2. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, amely DNS-molekula.

30

6. A 3. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, amely DNS-molekula.

35

7. Izolált DNS-molekula, amely a 19. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával rendelkezik.

40

8. Izolált DNS-molekula, amely a 19. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával komplementer szekvenciával rendelkező nukleinsavval hibridizálni képes szekvenciával rendelkezik.

40

9. Izolált DNS-molekula, amely a 22. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával rendelkezik.

45

10. Izolált DNS-molekula, amely a 22. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciával komplementer szekvenciával rendelkező nukleinsavval hibridizálni képes szekvenciával rendelkezik.

50

11. Izolált DNS-molekula, amely a 18. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

50

12. Izolált DNS-molekula, amely a 21. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

50

13. Izolált DNS-molekula, amely a 11. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

55

14. Izolált DNS-molekula, amely a 23. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

55

15. Izolált DNS-molekula, amely a 14., 15., 16. vagy 17. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

60

16. Izolált DNS-molekula, amely a 9. vagy 10. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

60

17. Izolált DNS-molekula, amely a 26. vagy 30. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

18. Izolált polipeptid, amely az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8. vagy 12. számú aminosavszekvenciával rendelkezik.

19. A 18. igénypont szerinti polipeptid, amely az 1. vagy 12. számú aminosavszekvenciával rendelkezik.

20. Expressziós vektor, amely a 19. vagy 22. számú aminosavszekvenciát kódoló nukleinsavszekvenciát tartalmazza.

21. A 20. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a 19. számú aminosavszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát tartalmazza.

22. A 20. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a 22. számú aminosavszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát tartalmazza.

23. A 20. igénypont szerinti expressziós vektor, amely továbbá replikációs origót, promotert és transzkripció terminációs szekvenciát tartalmaz.

24. A 23. igénypont szerinti expressziós vektor, amely továbbá szelekciós marker-szekvenciát tartalmaz.

25. A 24. igénypont szerinti expressziós vektor, amelyben a szelekciós marker phleomicinrezisztencia.

26. A 23. igénypont szerinti expressziós vektor, amely képes beépülni gombakromoszómákba.

27. A 20. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a 18. vagy 21. számú DNS-szekvenciával rendelkezik.

28. A 20. igénypont szerinti expressziós vektor, amely egy plazmid.

29. Expressziós vektor, amely a 23. számú DNS-szekvenciával rendelkező PVA-promotert tartalmazza.

30. A 29. igénypont szerinti expressziós vektor, amely továbbá replikációs origót, szerkezeti fehérjét kódoló DNS-t és transzkripció terminációs szekvenciát tartalmaz.

31. A 30. igénypont szerinti expressziós vektor, amelyben a szerkezeti fehérjét kódoló DNS a V-penicillin amidohidroláz (PVA)-kódolja.

32. A 30. igénypont szerinti expressziós vektor, amely továbbá szelekciós marker-szekvenciát tartalmaz.

33. A 32. igénypont szerinti expressziós vektor, amelyben a szelekciós marker phleomicinrezisztencia.

34. A 30. igénypont szerinti expressziós vektor, amely képes beépülni gombakromoszómákba.

35. Gazdasejt, amely a 20. igénypont szerinti expressziós vektort tartalmazza.

36. A 35. igénypont szerinti gazdasejt, amely eukarióta.

37. A 35. igénypont szerinti gazdasejt, amely *Fusarium species*.

38. A 35. igénypont szerinti gazdasejt, amely *Fusarium oxysporum*.

39. *Escherichia coli* ATCC 69720 biológiailag tiszta tenyészet.

40. *Escherichia coli* ATCC 69721 biológiailag tiszta tenyészet.

41. *Escherichia coli* ATCC 69722 biológiailag tiszta tenyészet.

42. Eljárás a 19. vagy 22. számú aminosavszekvenciával rendelkező polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 35. igénypont szerinti gazdasejtet a polipeptid kifejeződését eredményező körülmények között tenyésztjük.

43. A 42. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kifejeződést fenoxi-acetát jelenlétében történő tenyésztéssel indukáljuk.

- N-terminális:** Gly-Asn-Asp-Asp-Phe-Ala-[Ala/Lys]-Lys-[ ]-  
Ala-Ser-Leu-Lys-Lys-Ser-Leu-Lys-Leu-Pro-Gly-  
Thr-[Thr/Val]-Val-Tyr-Phe-Thr-Gln-His-Val
- A peptid:** Gly-Leu-Asn-[Ser/Pro]-Ser-Gln-[Ala/Leu]-  
[Asp/Glu]-Gln-Phe-Tyr-[Tyr/Arg]
- B1 peptid:** Leu-Val-Lys-Thr-Gly-Pro-Ala-[Ser/Lys]-[ ]-  
Val-Ser-Ile
- B2 peptid:** Gly-Asn-Asp-Asp-Phe-Ala-Ala-[Ser/Lys]-[ ]-  
Ala
- C peptid:** Gly-[ ]-[Asn/Lys]-Thr-Ala-Asp-Thr-Asn-Val-  
Leu-Leu-Ala-[Ile/Arg]-Val-Lys-Trp-Val-Glu-  
Glu-Gly
- D peptid:** Ile-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Glu-Asp-Gly-Leu-Ile-  
Ser-Ala-Glu-Asn-[Asn/Ser]-Asp-Tyr-Tyr-Asn-  
[Asn/His]-Val-[Val/Ser]-Ser-[Thr/Arg]
- E peptid:** Pro-Tyr-Asn-Asp

1. ábra

**Aminosav:** Val-Lys-Trp-Val-Glu-Glu-Gly  
**Rev.transz.:** GTN-AAR-TGG-GTN-GAR-GAR-GG  
**Komplement:** CC-YTC-YTC-NAC-CCA-YTT-NAC

**Próbák:** CC-YTC-YTC-CTC-GGA-YTT-NAC  
A  
G  
T

(N lehet A, G, T vagy C; R lehet A vagy G; Y lehet C vagy T)

2. ábra

**PVA: N-terminális**      G   N   D   D   F   A   A   K   C   A

**2585 transzlátum:**                      V   A   K   C   A

**2585 DNS:**                      TTTT TTTT GTAGCGAAATGCGCC

**PstI**  
|

**2585-M:**                      TTTT TTTT CTGCAGCGAAATGCGCC

**2585-FL:**                      G   N   D   D   F   A   A   K   C   A

**Transzlátum:**

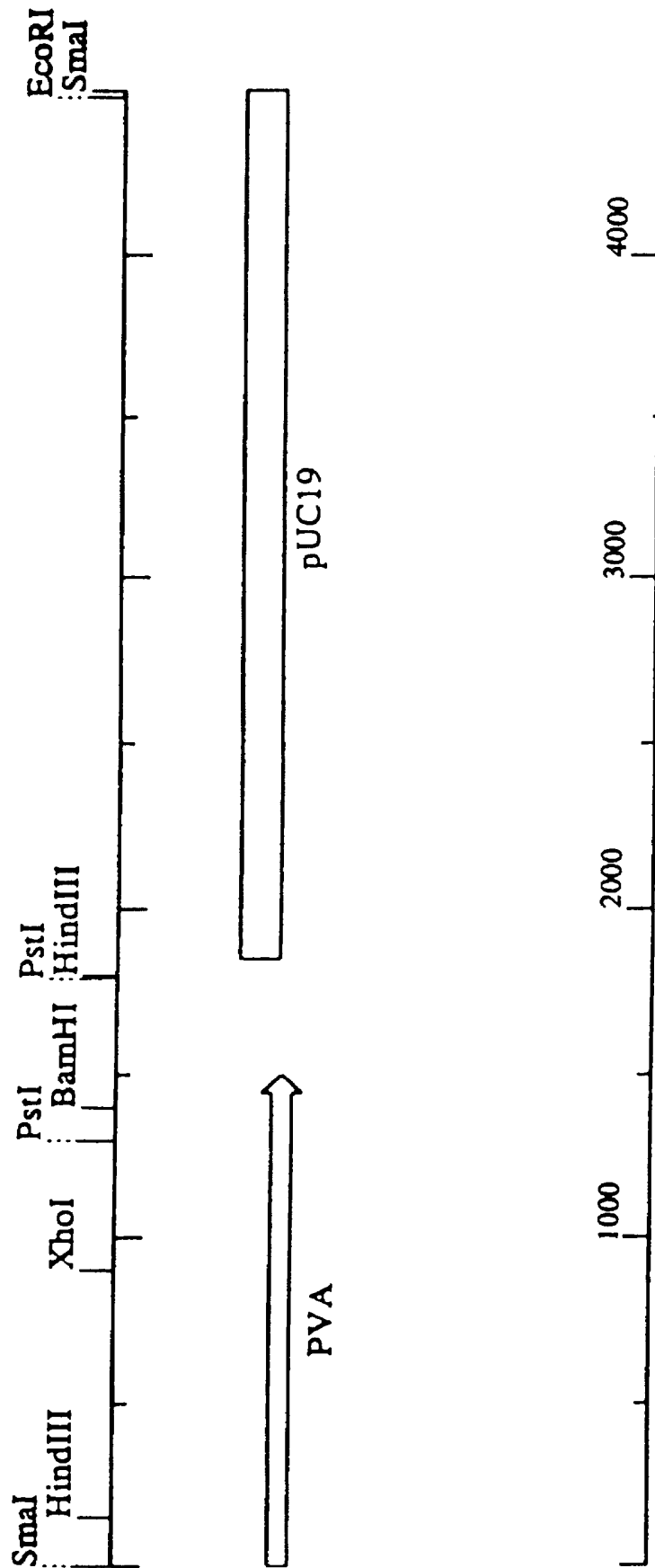
**Kódoló szál:**                      CCCGGGAACGACGACTTTGCA-GCGAAATGCGCC

**Templát szál:**                      GGGCCCTTGCTGCTGAA-ACGT CGCTTTACGCGG

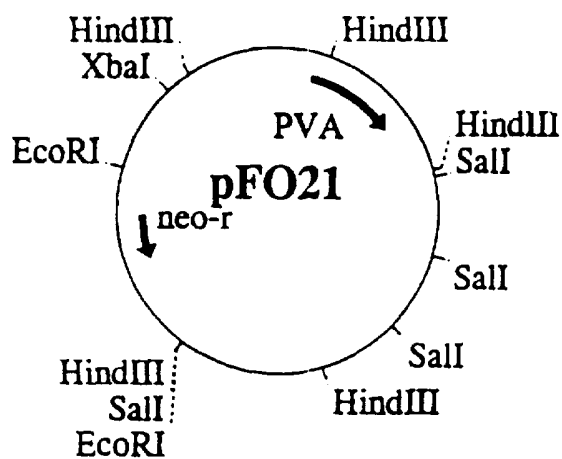
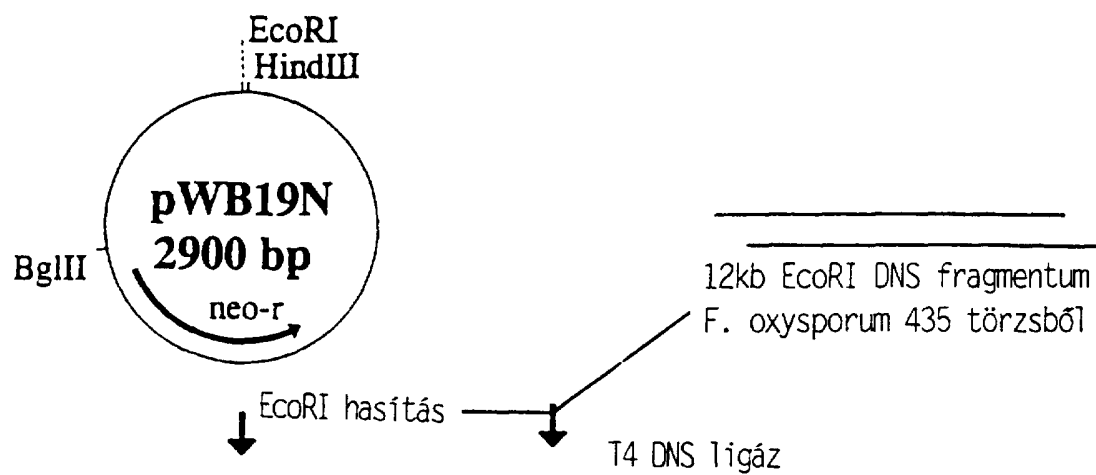
|  
**SmaI**

3. ábra



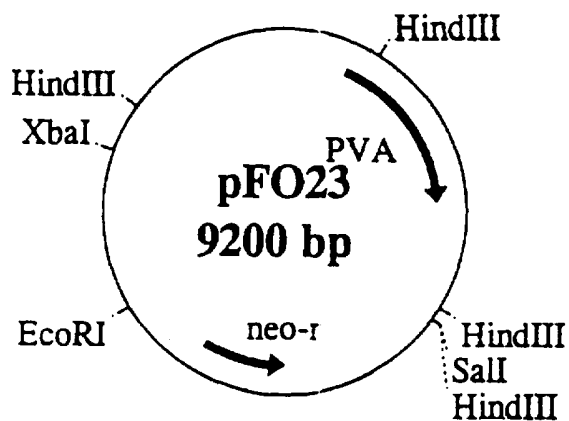
**2585-FL** (4490 bp )

4. ábra



↓ **SalI hasítás**

↓ **recikularizálás T4 DNS ligázal**



5. ábra

V-penicillin amidohidroláz gén *F. oxysporum*-ból (cDNS)

GGCAACGATGATTTTGCCGCGAAATGCGCCAGCCTCAAGAAGTCGCTCAAAC TCCCCGGC 60  
G N D D F A A K C A S L K K S L K L P G

ACCACCGTATACTTCACCCAGCATGTCTCGGCTGGTACCAACATCACTTTCCCGATAAT 120  
T T V Y F T Q H V S A G T N I T F P D N

CACCCGACCTGCGGTCTTAATACTATCAGGTTACGGACGTTGAGGTCTGCCGCGTGGCCATG 180  
H P T C G P N Y Q V T D V E V C R V A M

TTAGTCAAGACGGGACCCGCGCTCAAACGTTAGCATCGAAGCTTGGCTTCCCTTGAAC TGG 240  
L V K T G P A S N V S I E A W L P L N W

ACAGGTCGGTTCTTAGGAACTGGCAATGGTGGATTAGCTGGCTGTATGCCCTACAACGAT 300  
T G R F L G T G N G G L A G C M P Y N D

ATGGCGTACGGCAACAGTTTCGGCTTCGCCAGCGTTGGCACGAACAACGGACATAACGGA 360  
M A Y G N S F G F A S V G T N N G H N G

ACCTCAGGCCTACCCATGTACCGCAACCCAGGCCTGGTTGAGGACTTTGCCTATCGTGCG 420  
T S G L P M Y R N P G V V E D F A Y R A

GTGCACGCTGGTGCTGTTATCGGAAAGAAGATCACCCAGGGCTTTTACGGCAAGAAGTTC 480  
V H A G A V I G K K I T Q G F Y G K K F

AAGTCCTACTTTCTCGGCTGCTCGACAGGAGGACGTCAAGCAATGAAGTTGGCACAGAGC 540  
K S Y F L G C S T G G R Q A M K L A Q S

TTCCCCGAGGATTACGATGGCTATGTGGCAGGTGCTCCGGCTATGCGCTGGAACGGTCTT 600  
F P E D Y D G Y V A G A P A M R W N G L

CAGGCACGCTCTGGAAGTTTCTGGGGCATCACCGGCCCCCCTGGAGCTCCTGGCCATGTG 660  
Q A R S G S F W G I T G P P G A P G H V

ACTCCAGACGAGTGGGAAATGGTGCACAAGAGCGTCCTGACTCAGTGCACGAGCCCATT 720  
T P D E W E M V H K S V L T Q C D E P I

GATGGCGTCGATGACGGCGTGCTTGAGGACCCACCCCTCTGTCAGTACCGCCCTGAGGCT 780  
D G V D D G V L E D P T L C Q Y R P E A

CTCATCTGCGGTAAGGGCCAGACCGAGAATTGCCTGACCAAGGCCAAGATTGAGACGGTC 840  
L I C G K G Q T E N C L T K A K I E T V

CGCAAAGTCTTTTCTCCCCTATACACCACGAATGAGACATACGTCTACCCTCGAGCGGTT 900  
R K V F S P L Y T T N E T Y V Y P R A V

CCTGGTGCTAACGCTCTCTTTAACTTTGTTGTGCGCGAGACACCATTCGTTTACTCCACA 960  
P G A N A L F N F V V A E T P F V Y S T

GAATGGTACCAGTATGTCATCTGGGAAGACCCTGAGTGGAATCCTGACACTATTGGGCCC 1020  
E W Y Q Y V I W E D P E W N P D T I G P

6A. ábra



AAGGACTATGATAGAGGTGCCGAGATGAACCCCTATGACATTGAGACTTGGGAGGGAGAC 1080  
K D Y D R G A E M N P Y D I E T W E G D

CTGTCTAAGTTCCGCAAGCGTGGCAACAAGATGATTCACTGGCACGGCCTTCAGGACGGA 1140  
L S K F R K R G N K M I H W H G L Q D G

CTCATCAGCGCCGAGAACTCAGACGATTATTATAATCACGTGTCTCGAACAATGGGCCTC 1200  
L I S A E N S D D Y Y N H V S R T M G L

AATAGTAGCCAGCTGGACCAGTTTTATAGGTTCTTCCGCGTCAGTGGGTGTGGCCATTGC 1260  
N S S Q L D Q F Y R F F R V S G C G H C

AGCGCCGGAGACGGGGCTTCTCGCATTTGGAACAACGCCGGAACATGGGCGGCAAGACG 1320  
S A G D G A S R I G N N A G N M G G K T

GCAGATACTAATGTGCTTCTGGCTATTGTGAAATGGGTCGAGGAAGGCGTTGCGCCAGAA 1380  
A D T N V L L A I V K W V E E G V A P E  
(a 20-tagú próbával komplementer)

ACGATTGGGGGCTACAAGAACGTCGGCGGAACTGCAGATGGCGCTTTTGACTATGAGCGT 1440  
T I G G Y K N V G G T A D G A F D Y E R

AGGCATTGCCGATACCCACACCGCAATGTCTGGGACGGGAAGGGGAATGTGAAGGATCCC 1500  
R H C R Y P H R N V W D G K G N V K D P

GATAGCTGGAACGTGAAGATCTGAGGTGTGGCCCTAGGCTTTTGTGGCTGTCGTTAGGTG 1560  
D S W N C K I \*

GCATACGTATATAAGAGGATCACTGTGAACATGCTTTATGTTGTGCAAGAATTGATTGAG 1620

AATCAGATTGAGCTTGCAGAGCCAAGGCAAATAGACCCAACTGTTGACGAGATCTTGGCC 1680

GAAGGTAGAGGCAACGGGGAGAGAGACCATGGAAGACAAGGCGTAGAAAATGGCCGGGGA 1740

AGACGGAAAAAAAAAAACCCCCCCCCC 1767

6B. ábra

V-penicillin amidohidroláz gén *F. oxysporum*ból (genomiális)

AGGTGTCATACGCGTGTAACGAGGTATCACCTCCTTTCTTGGACTATTGGTTGGTTGTTTC 60  
TATGAAGGACCATCCGTTACCCCCGAGGAACCAGGGACATCTATGGCAAGAGTTTATCC 120  
CGAGGCATGTATATAATAAAGCTCTTGCCTCTCCTTCTCCTGACACTTCTCAGCCAGGCT 180  
\* transzkripció start  
CAGGAGGCTGGCAGTGAGTTGAATATCTATCTGTCTGATAGTTGTTTCGTCATCAGGCACT 240  
ATGCGCGTCAACTTCTCGACCCTGCTGCTTCCCAGCCTCCTCCAAGGGCTAGGTGCATGC 300  
M R V N F S T L L L P S L L Q G L G A C  
GCAGCTCCCAACAAAGGCAACGATGATTTTGCCGCGAAATGCGCCAGCCTCAAGAAGTCG 360  
A A P N K G N D D F A A K C A S L K K S  
CTCAAACCTCCCCGGCACCACCGTATACTTCACCCAGCATGTCTCGGCTGGTACCAACATC 420  
L K L P G T T V Y F T Q H V S A G T N I  
ACTTCCCCGATAATCACCCGACCTGCGGTCTAACTATCAGGTTACGGACGTTGAGGTC 480  
T F P D N H P T C G P N Y Q V T D V E V  
TGCCGCGTGGCCATGTTAGTCAAGACGGGACCCGCTCAAACGTTAGCATCGAAGCTTGG 540  
C R V A M L V K T G P A S N V S I E A W  
CTTCCCTTGAACCTGGACAGGTGCGTTCTTAGGAACTGGCAATGGTGGATTAGCTGGCTGT 600  
L P L N W T G R F L G T G N G G L A G C  
ATGCCCTACAACGATATGGCGTACGGCAACAGTTTCGGCTTCGCCAGCGTTGGCACGAAC 660  
M P Y N D M A Y G N S F G F A S V G T N  
AACGGACATAACGGAACCTCAGGCCTACCCATGTACCGCAACCCAGGCGTGGTTGAGGAC 720  
N G H N G T S G L P M Y R N P G V V E D  
TTTGCCTATCGTGCGGTGCACGCTGGTGCTGTTATCGGAAAGAAGATCACCCAGGGCTTT 780  
F A Y R A V H A G A V I G K K I T Q G F  
TACGGCAAGAAGTTCAAGTCCTACTTTCTCGGCTGCTCGACAGGAGGACGTCAAGCAATG 840  
Y G K K F K S Y F L G C S T G G R Q A M  
AAGTTGGCACAGAGCTTCCCCGAGGATTACGATGGCTATGTGGCAGGTGCTCCGGCTATG 900  
K L A Q S F P E D Y D G Y V A G A P A M  
CGCTGGAACGGTCTTCAGGCACGCTCTGGAAGTTTCTGGGGCATCACCGGCCCCCTGGA 960  
R W N G L Q A R S G S F W G I T G P P G  
GCTCCTGGCCATGTGACTCCAGACGAGTGGGAAATGGTGCACAAGAGCGTCCTGACTCAG 1020  
A P G H V T P D E W E M V H K S V L T Q  
TGCGACGAGCCCATTTGATGGCGTCGATGACGGCGTGCTTGAGGACCCACCCTCTGTCAG 1080  
C D E P I D G V D D G V L E D P T L C Q

7A. ábra

TACCGCCCTGAGGCTCTCATCTGCGGTAAGGGCCAGACCGAGAATTGCCTGACCAAGGCC 1140  
Y R P E A L I C G K G Q T E N C L T K A

AAGATTGAGACGGTCCGCAAAGTCTTTTCTCCCCTATACACCACGAATGAGACATACGTC 1200  
K I E T V R K V F S P L Y T T N E T Y V

TACCCTCGAGCGGTTCTGCTAAGCTCTCTTTAACTTTGTTGTCGCCGAGACACCA 1260  
Y P R A V P G A N A L F N F V V A E T P

TTCGTTTACTCCACAGAATGGTACCAGTATGTCATCTGGGAAGACCCTGAGTGGAAATCCT 1320  
F V Y S T E W Y Q Y V I W E D P E W N P

GACACTATTGGGCCCCAAGGACTATGATAGAGGTGCCGAGATGAACCCCTATGACATTGAG 1380  
D T I G P K D Y D R G A E M N P Y D I E

ACTTGGGAGGGAGACCTGTCTAAGTTCCGCAAGCGTGGCAACAAGATGATTCACTGGCAC 1440  
T W E G D L S K F R K R G N K M I H W H

GGCCTTCAGGACGGACTCATCAGCGCCGAGAACTCAGACGATTATTATAATCACGTGTCT 1500  
G L Q D G L I S A E N S D D Y Y N H V S

CGAACAATGGGCCTCAATAGTAGCCAGCTGGACCAGTTTTATAGGTTCTTCCGCGTCAGT 1560  
R T M G L N S S Q L D Q F Y R F F R V S

GGGTGTGGCCATTGCAGCGCCGAGACGGGGCTTCTCGCATTGGAAACAACGCCGGAAC 1620  
G C G H C S A G D G A S R I G N N A G N

ATGGGCGGCAAGACGGCAGATACTAATGTGCTTCTGGCTATTGTGAAATGGGTCGAGGAA 1680  
M G G K T A D T N V L L A I V K W V E E  
(a 20-tagú próbával komplementer)

GGCGTTGCGCCAGAAACGATTGGGGGCTACAAGAAGCTCGGCGGAAGTGCAGATGGCGCT 1740  
G V A P E T I G G Y K N V G G T A D G A

TTTGAATATGAGCGTAGGCATTGCCGATACCCACACCGCAATGTCTGGGACGGGAAGGGG 1800  
F D Y E R R H C R Y P H R N V W D G K G

AATGTGAAGGATCCCGATAGCTGGAAGTGTAAAGATCTGAGGTGTGGCCCTAGGCTTTTGT 1860  
N V K D P D S W N C K I \*

GGCTGTGCTTAGGTGGCATACTATATAAGAGGATCACTGTGAACATGCTTTATGTTGTG 1920

CAAGAATTGATTGAGAATCAGATTGAGCTTGAGAGCCAAGGCAAATAGACCCAACTGTT 1980

GACGAGATCTTGGCCGAAGGTAGAGGCAACGGGGAGAGAGACCATGGAAGACAAGGCGTA 2040

GAAAATGGCCGGGGAAGACGGGCTGTGCGCGATGGAGTAGCAACAGCTGTCACTGGTGGT 2100

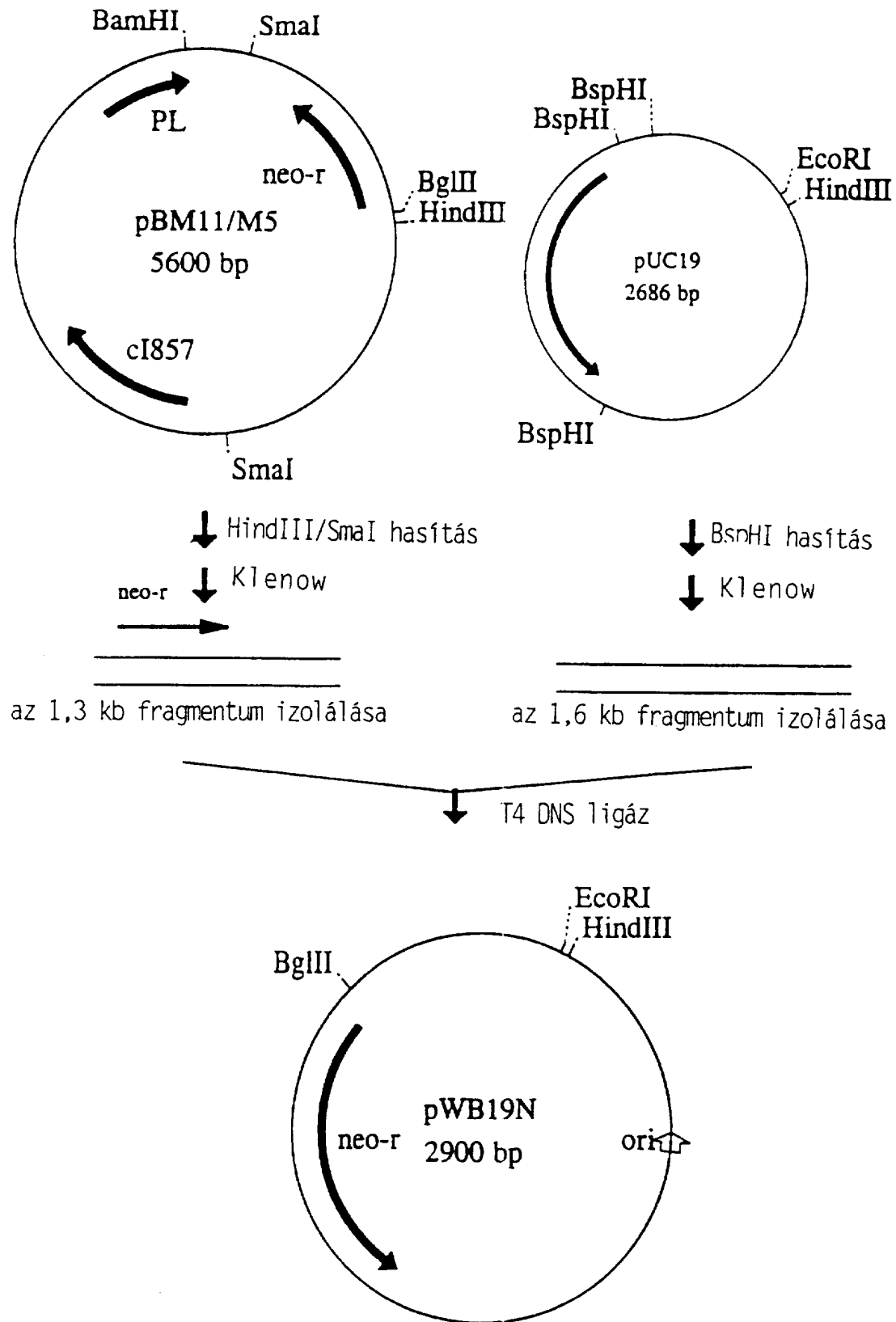
CAATGACTACACTTCTGAGCGGCGAGAGATTATAGGGACCGCACACAGGCCATCATTTCC 2160

CGATAACTAATGGAGACGCAATGGAGCGATGTTTAAATGCGACAAGACTGCCATCATCTA 2220

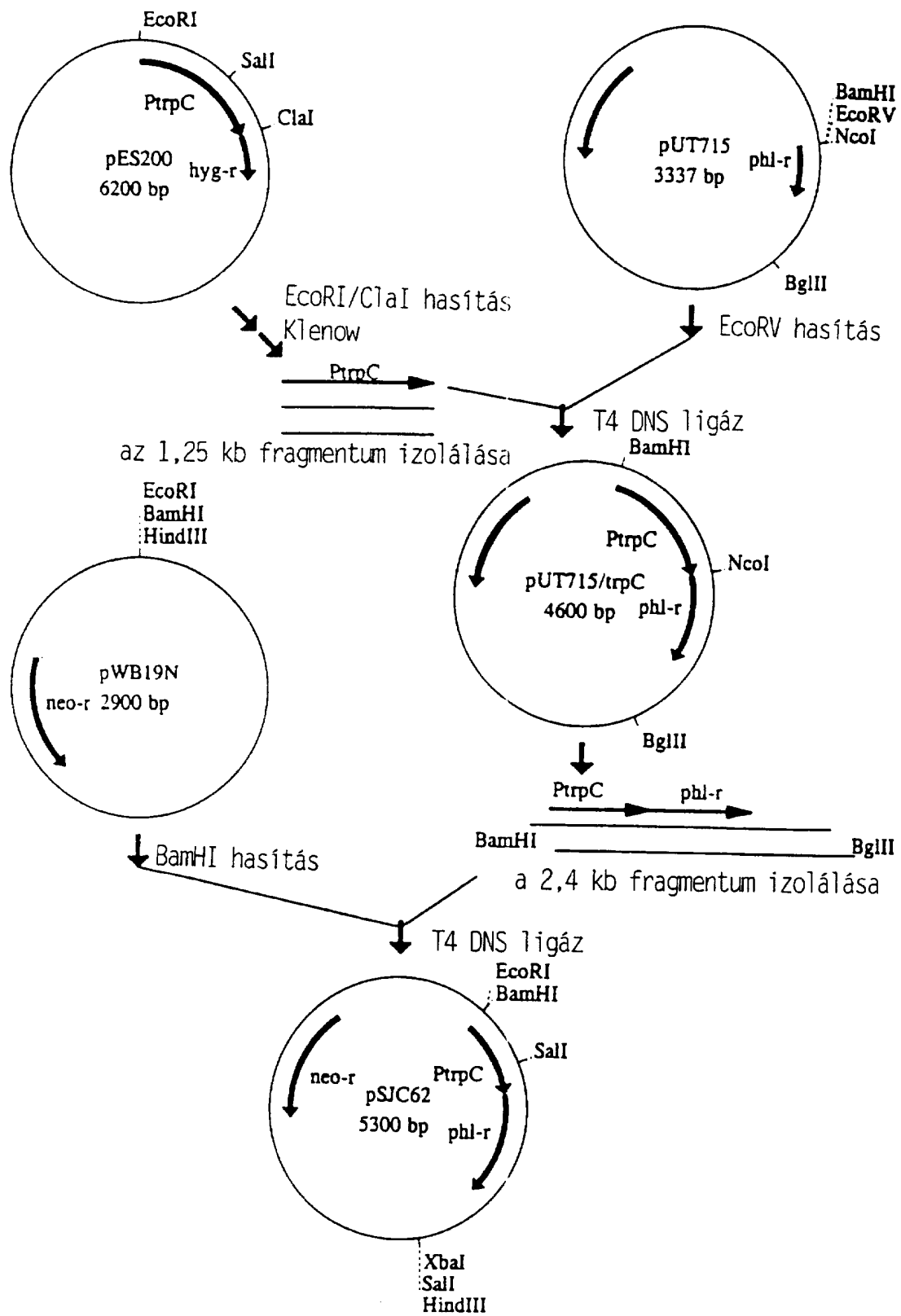
GGTACTTCATGCGTCGCTAAACGCACCAATGCTGCGCTGCTCATGATTGTAACTTAGTT 2280

TATA 2284

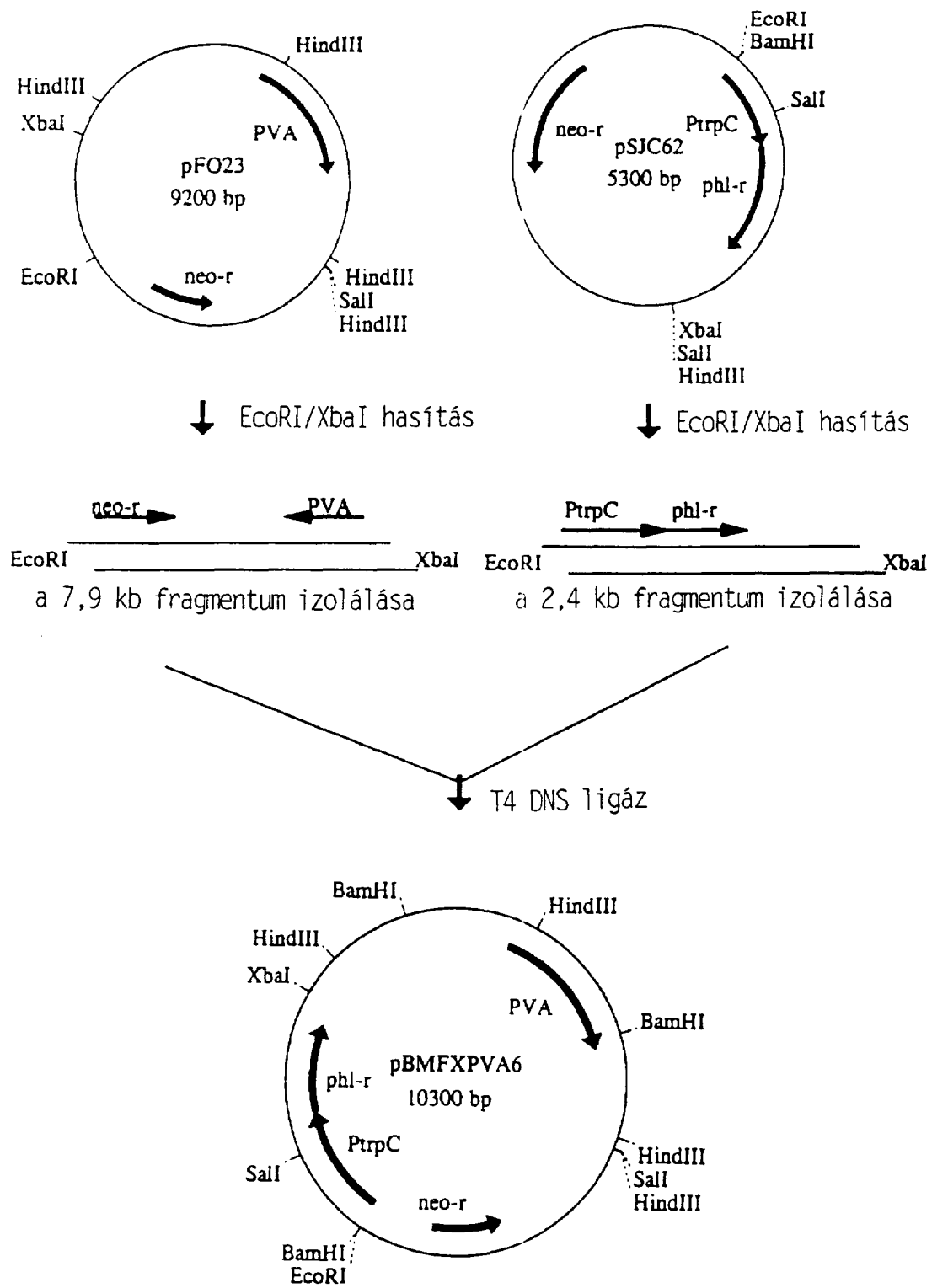
7B. ábra



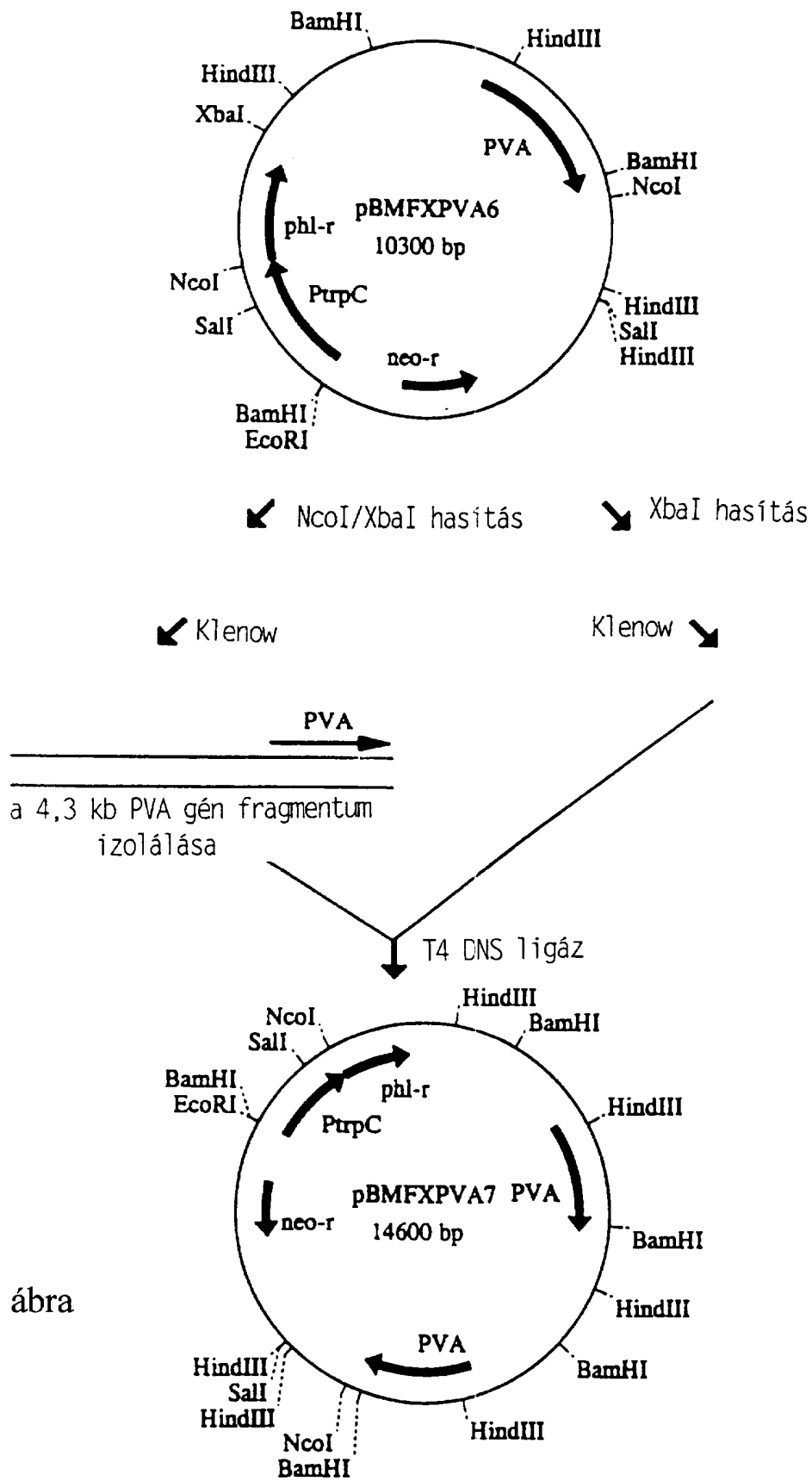
8. ábra



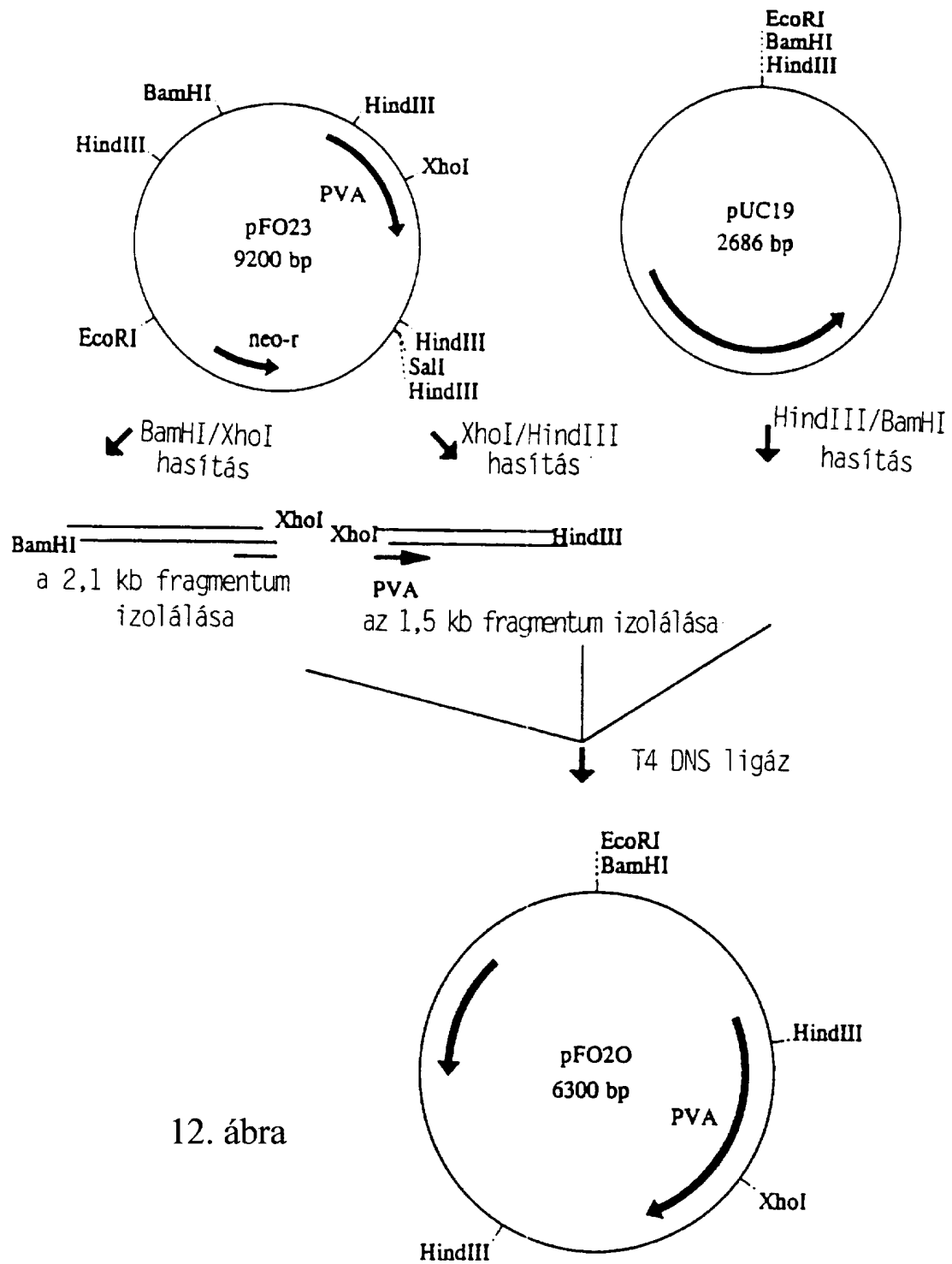
9. ábra



10. ábra

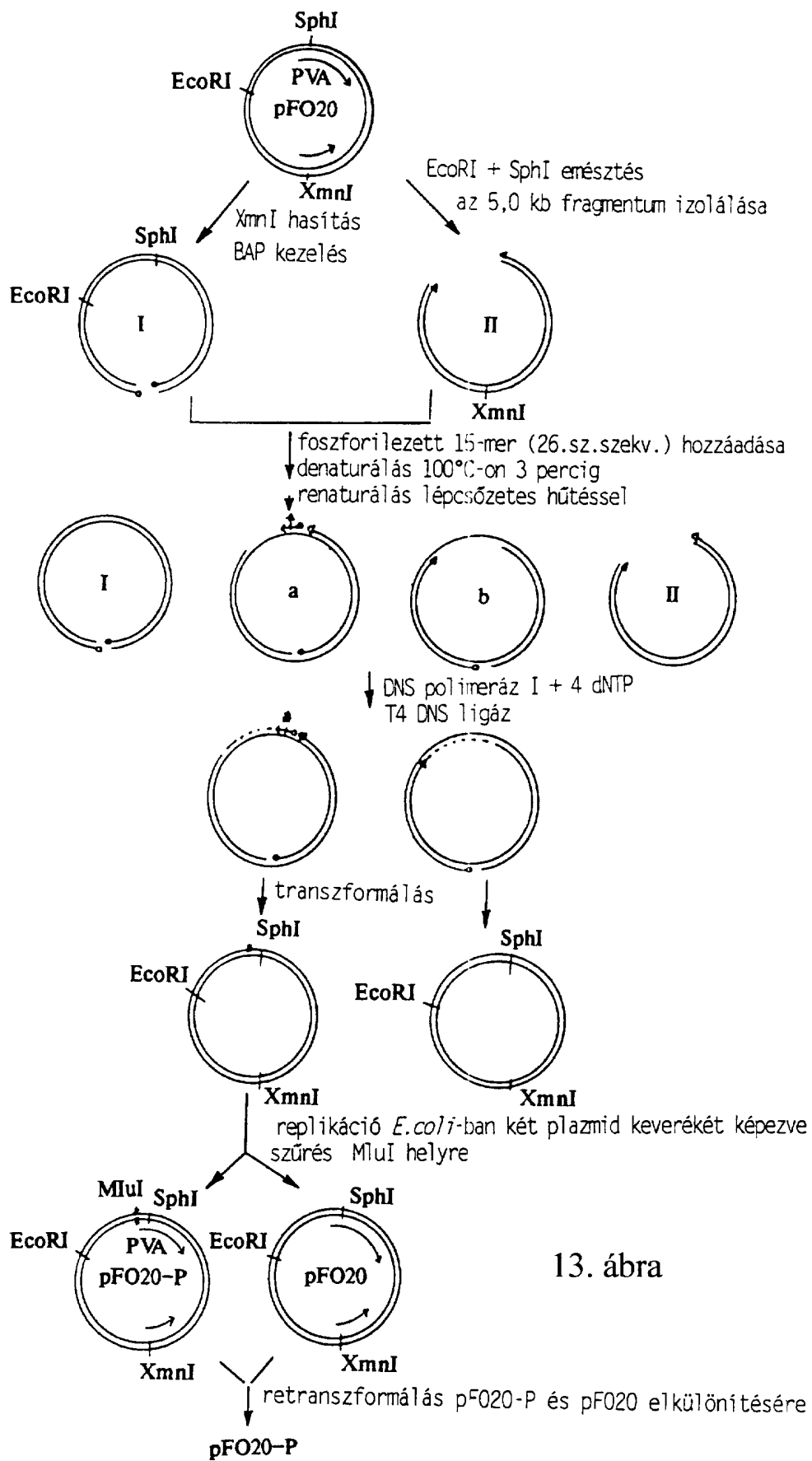


11. ábra

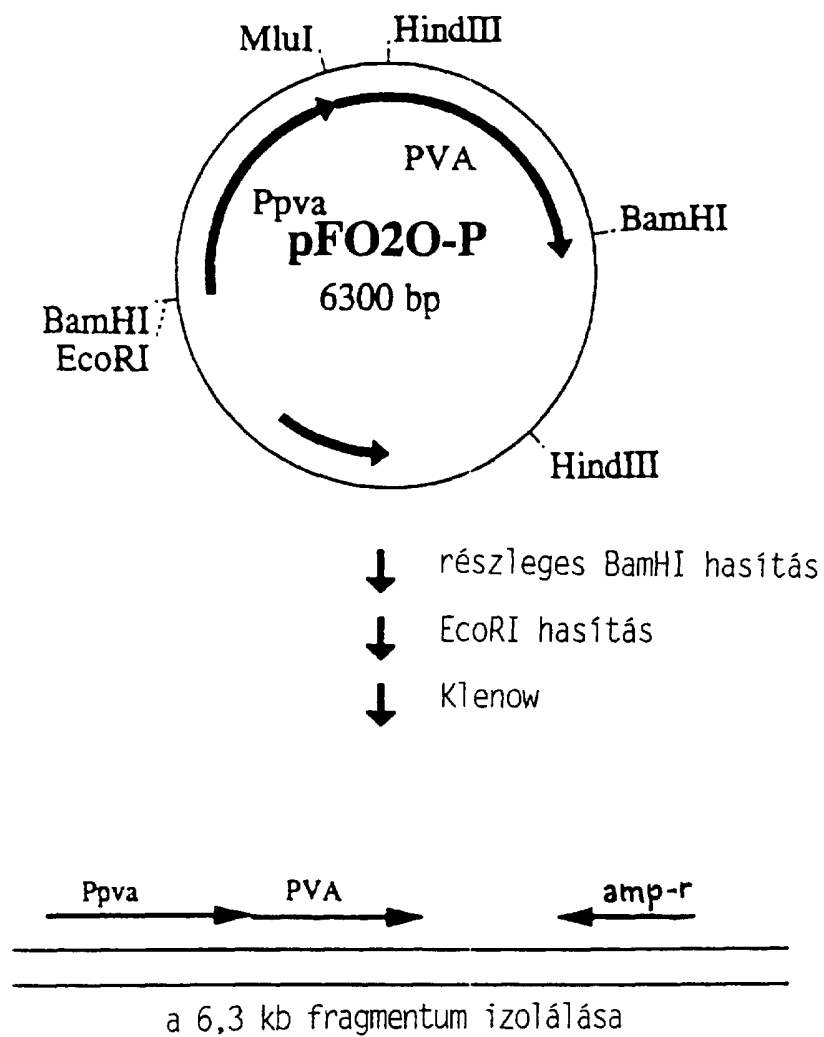


12. ábra

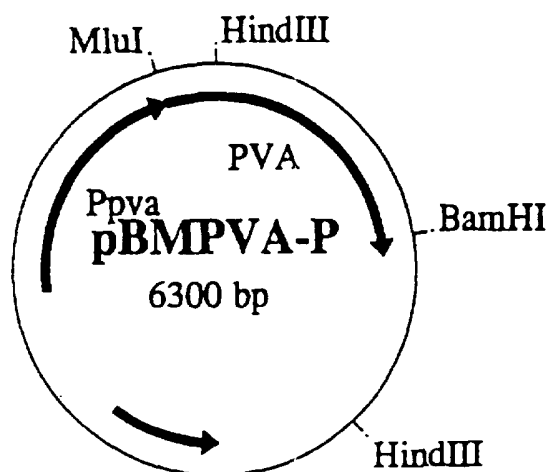




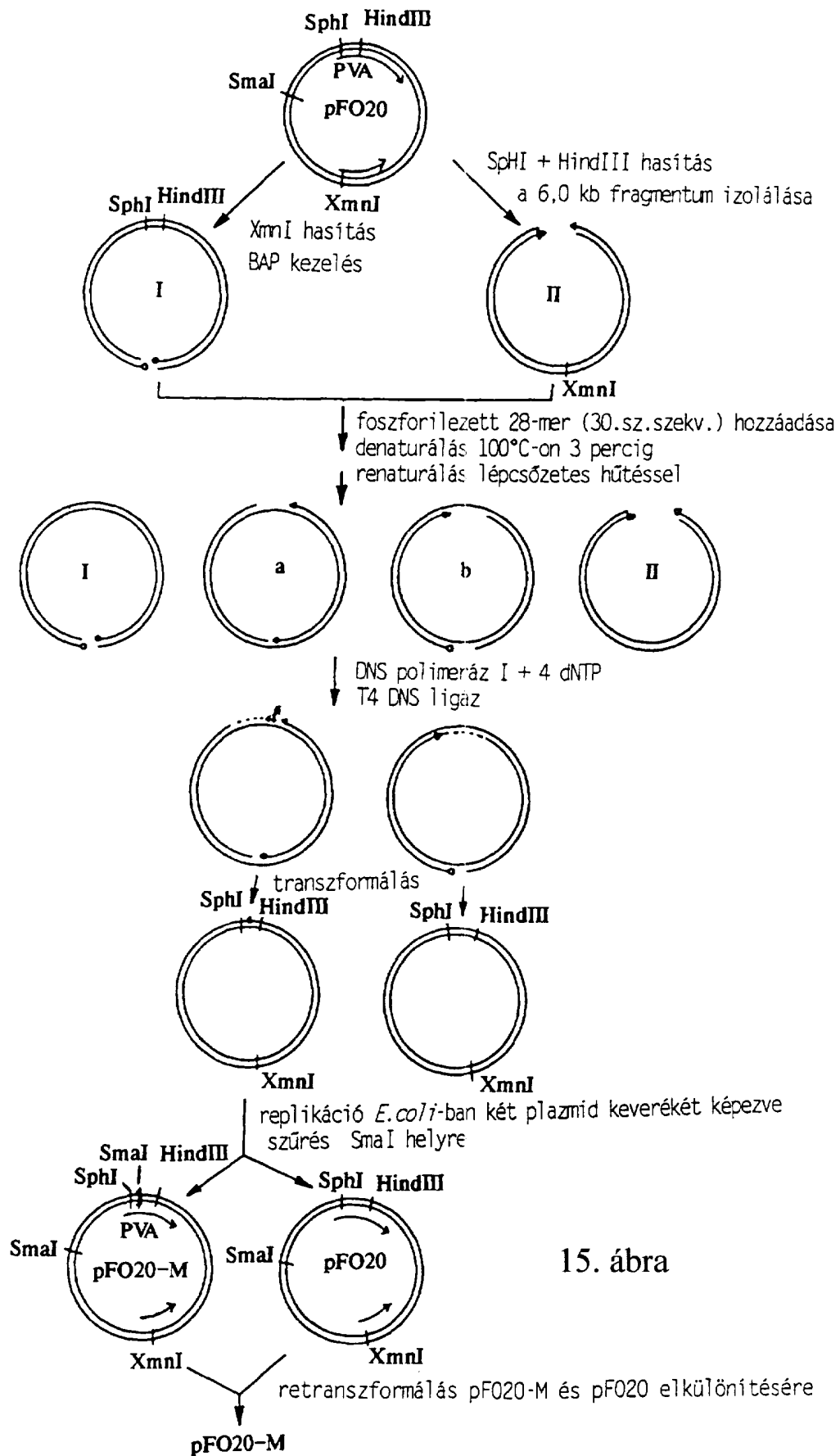
13. ábra



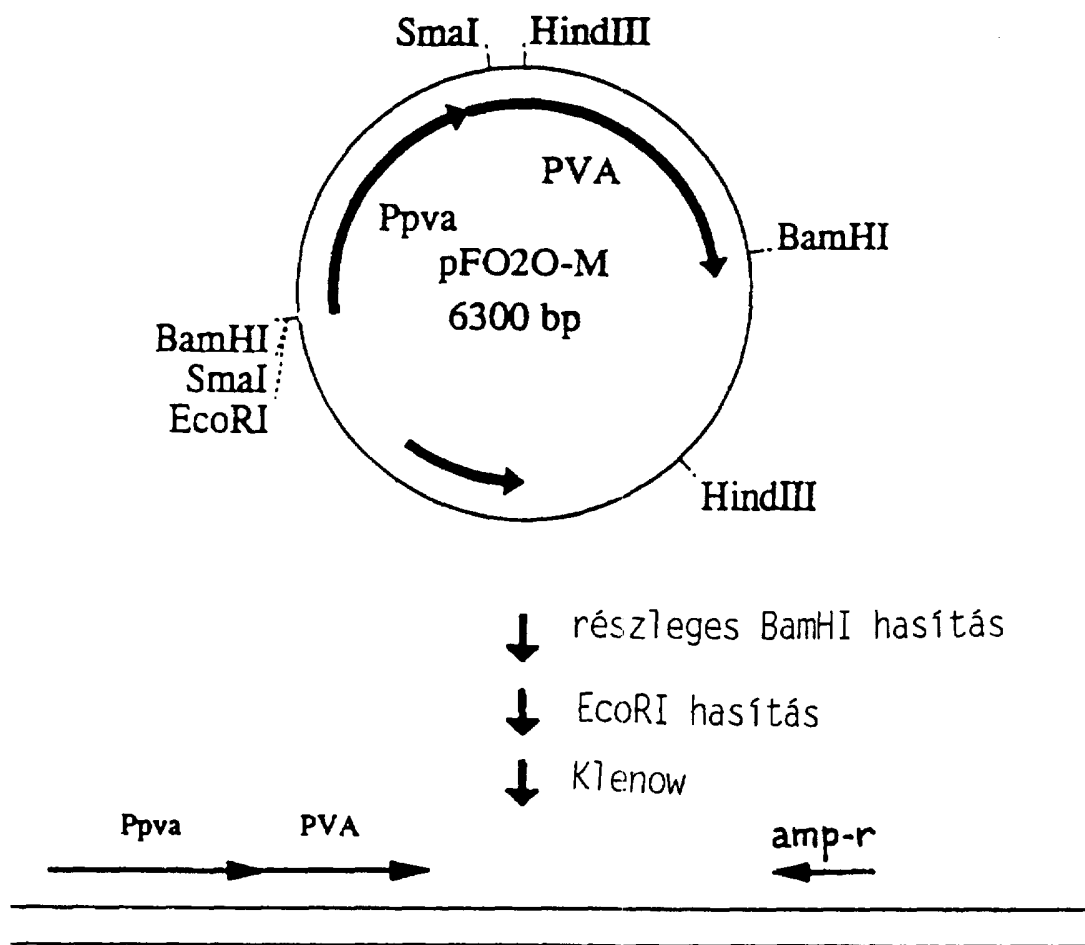
↓ T4 DNS ligáz



14. ábra

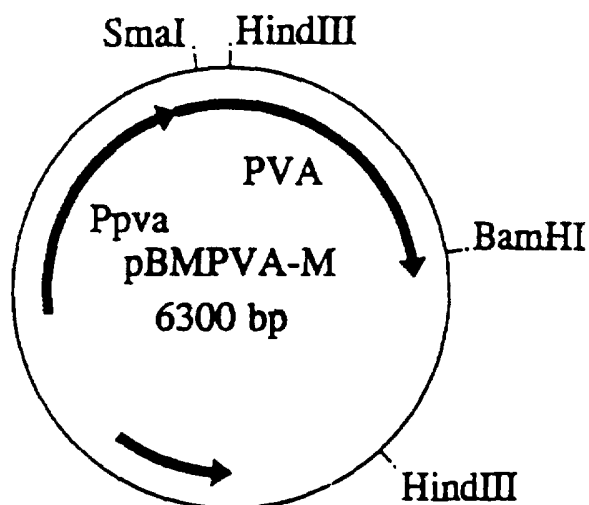


15. ábra

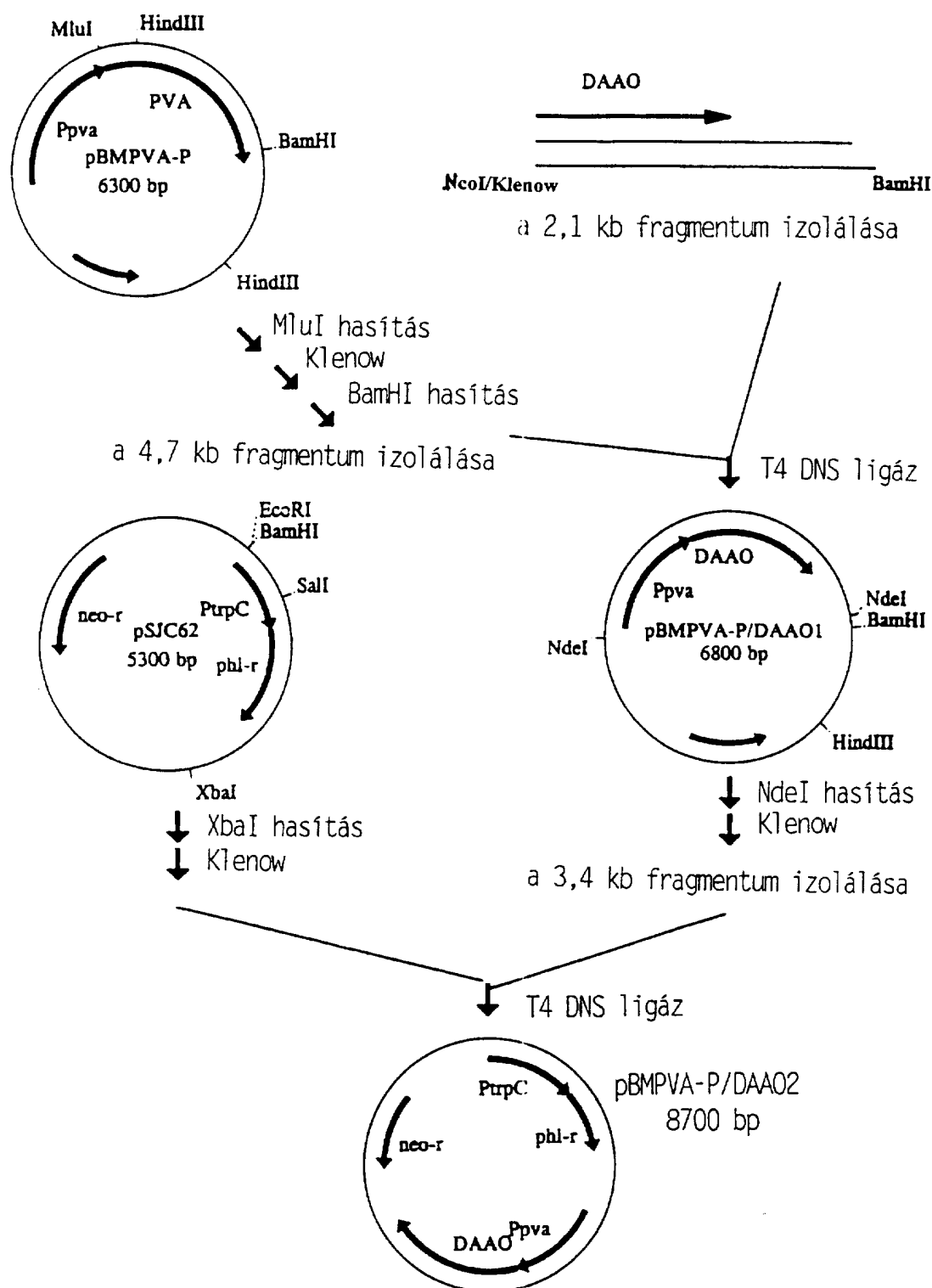


a 6,3 kb fragmentum izolálása

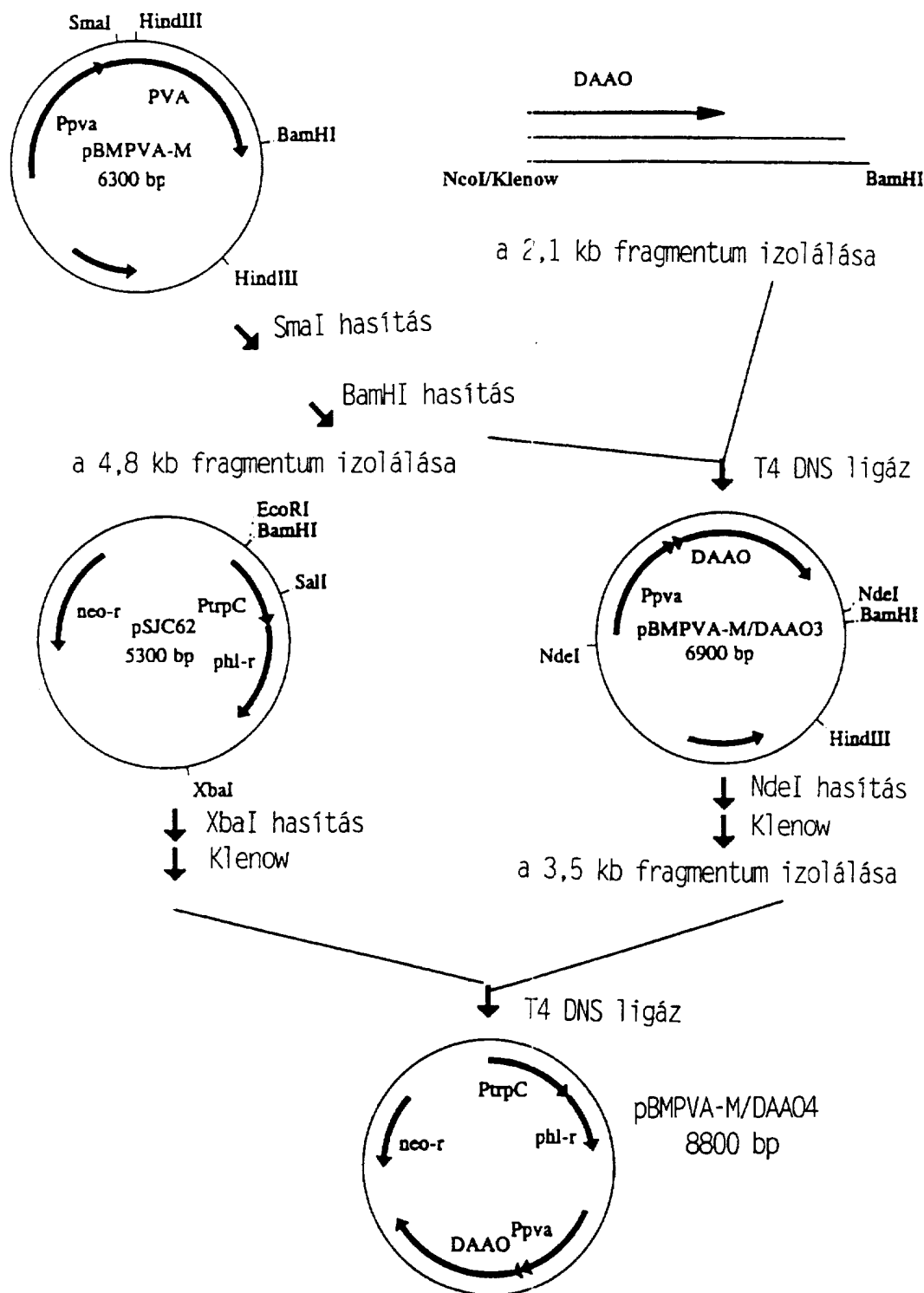
↓ T4 DNS ligáz



16. ábra



17. ábra



18. ábra