P9502318

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

72848

Bioszintetikus inzulinprekurzorokat kódoló DNS-szekvenciák, a szekvenciákat tartalmazó transzformált sejtek és eljárások inzulin, valamint egyéb gyógyászatilag jelentős peptidek és fehérjék előállítására

KIVONAT

A találmány tárgyát B-Pg-A képletű inzulin prekurzorokat kódoló DNS-szekvenciák képezik, ahol B és A sorrendben az inzulin B- és A-láncát jelenti, Pg pedig módosított C-peptidet jelöl, vagy akárhány aminosavat, melyek legalább egy N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmaznak. A találmány tárgyát képezi egy eljárás is inzulin és más gyógyászatilag jelentős peptidek és fehérjék előállítására, alkalmas gazdasejtek, előnyösen gombasejtek tenyésztése útján, melyek olyan vektorral vannak transzformálva, amely az említett képlet szerinti inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciát tartalmazza. A találmány tárgyát képezik olyan DNS-szekvenciák is, melyek gyógyászatilag jelentős peptideket és fehérjéket kódolnak, melyekben valamely távtartó-régióban egy nem esszenciális helyre N-glikozilálási konszenzus szekvencia van bejuttatva, a peptid vagy protein nagyobb mértékű expressziója vagy szekréciója elérésének céljából.

jelleműre lére Ø
Bence

Aktaszámunk: 82284-5076/PÁ

P9502318

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Képviselő:
DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

Bioszintetikus inzulinprekurzorokat kódoló DNS-szekvenciák, a szekvenciákat tartalmazó transzformált sejtek és eljárások inzulin, valamint egyéb gyógyászatilag jelentős peptidek és fehérjék előállítására

A találmány tárgyát bioszintetikus inzulinprekurzorokat kódoló DNS-szekvenciák képezik, valamint eljárások inzulin és egyéb gyógyászatilag jelentős peptidek és fehérjék előállítására, az említett DNS-szekvenciákat hordozó transzformált sejtek alkalmazásával.

Az inzulin egy hormon, melynek elsődleges szerepe a glükoz transzport szabályozása, a véráramból azokba a sejtekbe, ahol a glükóz metabolizálódik.

Az inzulin két aminosavláncból áll: a 21 aminosavból álló A-láncból, valamint a 30 aminosavból álló B-láncból, és a láncokat két diszulfid-híd köti össze. Egy harmadik diszulfid-híd pedig az A-láncon belül található.

Az inzulinmolekula elsődleges formája egyetlen polipeptid-lánc formájában szintetizálódik, melyet preproinzulinnek neveznek, amely egy szignál-peptidből és a proinzulinból áll. A szignál-peptid irányítja az újonnan keletkezett polipeptid-lánc endoplazmatikus endoplazmatikus retikulumba történő bejutását. Az endoplazmatikus retikulum belső terében a preproinzulinból proinzulin keletkezik, mihelyt a polipeptid-lánc átjut az

endoplazmatikus retikulum membránján. A proinzulin tartalmaz egy 35 aminosavból álló láncot is, amely az inzulinban nincs jelen. Ez a kapcsolópeptid vagy C-peptid a későbbi inzulinmolekula B-láncának C-terminális végét kapcsolja a későbbi inzulinmolekula A-láncának N-terminális végéhez. Az endoplazmatikus retikulum belső teréből a proinzulin a Golgi-készülékbe szállítódik, ahol megkezdődik a kapcsolópeptid proteolizise. A kapcsoló- vagy C-peptidet egy olyan enzimrendszer hasítja ki, amely hasonló a tripszin/karboxipeptidáz-B-rendszerhez. A hasító enzimrendszer a két egymást követő bázisos aminosavat tartalmazó szekvenciarészletnél hat, és inzulin keletkezik [Steiner és mtsai.: J. Cell. Biol. 24, 121 (1984)].

A C-peptid jelentősége abban áll, hogy összekapcsolja a B- és A-láncokat, és ily módon lehetővé teszi, hogy a diszulfid-hidak az inzulinmolekulán belül megfelelő módon alakuljanak ki [Bell és mtsai.: Nature 284, 26 (1980)], valamint abban, hogy elősegíti, hogy a tripszinszerű konvertáló enzim a proinzulint a kétbázisos aminosavat tartalmazó helyen hasítsa el [Thim és mtsai.: PNAS, 83, 6766 (1986)].

Bioszintetikus humán inzulin előállítását elsősorban *Escherichia coli* baktériumban és *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben írták le. Minden leírt rendszer vonatkozásában elmondható, hogy az expresszált DNS-szekvencia vagy a teljes proinzulin kódolja, vagy a proinzulin egy módosított részletét, vagy az A- és B-láncokat külön-külön.

Az *E. coli* baktériumban az inzulint egyrészt termeltették különálló A- és B-láncok formájában [Chance és mtsai.: Diabetes Care 4, 147 (1982)], másrészt pedig proinzulin formájában (EP 55945).

Az *S. cerevisiae* élesztőben az inzulint proinzulinon keresztül termeltették, bár meglehetősen alacsony kitermeléssel (EPA 121884). A C-peptid bizonyos módosításai élesztőben fokozzák az inzulinkitermelést és segítik az inzulinmolekula helyes térszerkezetének kialakulását.

A DK-A-5284/87 számú szabadalmi bejelentéshez mellékelt leírásban B-X-A képlettel jellemezhető inzulin prekurzorokat tárnak fel, amely képletben B és A az inzulin B- és A-láncait jelenti, X pedig egy 2-35 aminosavat tartalmazó peptidet.

Az EP-A-195.691 számú szabadalmi bejelentéshez csatolt találmányi leírás B-X-Y-A képlettel jellemezhető inzulin prekurzorokat tár fel, mely képletben B és A az inzulin B- és A-láncát jelzi, X és Y pedig vagy lizint vagy arginint jelöl.

Az EP-A-163.529 számú szabadalmi bejelentéshez mellékelt leírás olyan inzulinprekurzorokat tár fel, melyek a B(1-29)-A(1-21)-láncokat tartalmazzák, melyeket egy rövid, 2-8 aminosavból álló peptid köt össze. Az EP-A-347.845 számú szabadalmi bejelentéshez mellékelt leírás a desz-B(30)-inzulin prekurzor olyan módosításait tárja fel, melyek a következő képlettel jellemezhetők: B(1-29)-X_1-X_2-Y_2-Y_1-A(1-21).

Az EP 249.350 számú szabadalmi leírás fehérjék gombasejtekben történő termelésére és szekretálására alkalmas glükoamiláz-promótert és szignálszekvenciát tár fel. A leírásban példaként egy háromszorosan ismétlődő proinzulin szekvenciát is bejuttattak egy ilyen expressziós vektorba, és expresszálták.

Sok terápiás és diagnosztikai célra alkalmas polipeptid - például az eritropoietin, a tPA és a VIII.faktor - N-glikozilálva van [Parekh és mtsai.: TIBTECH 7, 117 (1989)].

Azt is kimutatták, hogy a marha kimozin (glikokimozin) termelődésének szintje a *A. niger* var. *awamori* gombában háromszorosára emelkedett, amennyiben a kódoló szekvenciába beépítettek egy N-glikozilálási konszenzus szekvencia részletet. Még magasabb kitermelést lehetett elérni abban az esetben, hogyha a prokimozingént a glükoamilázgénnel fuzionáltatták, de amennyiben a glikokimozingént fuzionáltatták a glükoamilázgénnel, további növekedés nem volt tapasztalható a kitermelésben [Berka és mtsai.: Biochem. Soc. Trans. 19, 681 (1991)].

Az aszparaginsav protenáz (renin) esetében, amely egy mikrobiális eredetű enzim és a kimozint helyettesíti, kimutatták, hogy a hiperglikolizáció csökkentheti az enzim aktivitását, amennyiben a molekula egy kritikus helyén történik [Berka és mtsai.: Biochem. Soc. Trans. 19, 681 (1991); Aikawa és mtsai.: J. Biol. Chem. 265, 13955 (1990)].

Amennyiben a renin kódoló régiójában egy glikolizált aszparagint elmutáltatnak, élesztő sejtekben az enzim szekréciójában jelentős csökkenést tapasztaltak [Aikawa és mtsai.: J. Biol. Chem. 265, 13955 (1990)].

A találmány tárgyát új bioszintetikus inzulin prekurzorokat kódoló DNS-szekvenciák képezik, valamint eukarióta sejtek, különösen gombasejtek alkalmazása inzulin előállítására.

A találmányt tárgyát közelebbről olyan DNS-szekvenciák képezik, melyek a B-Pg-A képlettel jellemezhető inzulin prekurzorokat kódolnak, ahol B és A az inzulin B- és A-láncait jelenti, Pg pedig egy módosított C-

peptidet jelöl, amely akárhány aminosavat tartalmazhat, de tartalmaz legalább egy N-glikozilálási konszenzus szekvenciarészletet. A Pg-szekvencia a B- és az A-láncokat preteolitikus hasítóhelyeken vagy specifikus kémiai hasítóhelyeken keresztül köti össze.

A proinzulingén módosítását előnyösen az AsnXSer képletű N-glikozilálási szekvencia kiépítésével hajtjuk végre. Ezt elérhetjük például úgy, hogy a C-peptid szekvenciájában megváltoztatjuk az Ala-C-20 amimosavat kódoló GCC-kódont Asn aminosavat kódoló AAC-kódonra.

Hasonló módon alakíthatjuk át a desz-B(30) proinzulint is.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy a RIA-eljárással meghatározható immunreaktív inzulin termelődésének mértéke lényegesen nagyobb olyan transzformánsokban, amelyek egy védőfehérjéhez fuzionáltatott B-Pg-A képletű proinzulint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaznak, mint azokban a transzformánsokban, melyek védőfehérjéhez fuzionáltatott módosítatlan szekvenciájú proinzulint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaznak. Azok a sejtek, melyek nem fuzionált proinzulint vagy nem fuzionált módosított N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó proinzulint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaztak, rendkívül kis mértékben termeltek RIA-eljárással kimutatható immunreaktív inzulint, vagy egyáltalán nem termeltek ilyet.

Megállapíthatjuk tehát, hogy amennyiben a távtartó-régióba N-glikozilálási konszenzus szekvenciát juttatunk, amely szekvencia az érett inzulin molekulának nem része, az említett fuzionált inzulin prekurzorokat kódoló DNS-szekvenciával transzformált gombasejtekben az expresszió mértéke jelentősen fokozódik. A fuzionált protein vagy magában a gazdaszerve-

zetben átalakul érett inzulin molekulává, vagy átalakítható későbbi enzimatikus vagy kémiai lépések alkalmazásával is.

A találmány szerinti módosított inzulin prekurzorokat kódoló DNS-szekvenciát előállíthatjuk a teljes DNS-szekvencia kémiai szintézise útján, de alkalmazhatunk PCR-eljárást vagy *in vitro* mutagenézist is. Az említett kódoló szekvenciákat kódonhasználat szempontjából optimizálhatjuk, annak érdekében, hogy az alkalmazott gazdaszervezetben, előnyösen egy gombatörzsben a fehérjetermék expressziója fokozódjék.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás inzulin előállítására, mely eljárás szerint alkalmas sejteket, előnyösen gombasejteket, melyek a B-Pg-A képletű inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciával vannak transzformálva, alkalmas táptalajban tenyésztünk.

A fenti képletű peptid expresszióját és szekrécióját olyan vektor alkalmazásával valósíthatjuk meg, melyben a kódoló szekvencia a kiválasztott gazdaszervezetben működőképes promóter, szignálszekvencia és terminátor szabályozása alatt áll. Ilyen szabályozó szekvenciaként alkalmazhatjuk például az aszpergilusz fajban történő expressziót lehetővé tévő P_{glaA}-szekvenciát, valamint a *glaA*-gén szignál szekvenciáját, vagy annak egy részletét [Cullen és mtsai.: Biotechnology, 5, 369 (1987)]. A találmány szerinti peptidet expresszióját és szekrécióját megvalósíthatjuk olyan expressziós vektor alkalmazásával is, melyben a fenti képletű inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvencia egy védőfehérjét kódoló génnel van fuzionáltatva, valamilyen enzimatikusan vagy kémiai úton hasítható szekvenciarészleten keresztül [Ward és mtsai.: Biotechnology 8, 435 (1990); Broekhuijsen és mtsai.: J. Biotech. 135, (1993)].

A találmány tárgyát képezik továbbá gyógyászatilag alkalmazható peptideket vagy fehérjéket kódoló DNS-szekvenciák, mely szekvenciákban a kódolt termék egy nem esszenciális részén vagy valamely távtartó-régiójában, amely az érett fehérjében jelen nem lévő részletet kódol, egy N-glikozilálási konszenzus szekvencia van kialakítva, a fehérjetermék nagyobb mértékű expressziója vagy szekréciója céljából.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán a természetes és az optimizált kódonhasználatú proinzulingén nukleotid szekvenciáját láthatjuk, valamint a nukleotid szekvenciáknak megfelelő aminosav sorrendet. Az ábrán mind a nukleotidok, mind pedig az aminosavak vonatkozásában a hagyományos rövidítéseket alkalmaztuk.

A 2. ábrán kétféle humán proinzulingén kifejezésére alkalmas expressziós egységet láthatunk, valamint a humán proinzulingén és az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns gén vázlatos ábrázolását.

A 3. ábrán a humán proinzulingén és az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns gén kifejezésére alkalmas két expressziós egység kialakításának stratégiáját láthatjuk. Az expressziós egységeket külön-külön szintetizált átfedő oligonukleotidok és PCR-eljárás alkalmazásával állítottuk elő.

A 4. ábrán 14 oligonukleotid szekvenciáját láthatjuk, melyeket a humán proinzulingén és az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns gén előállítása céljából terveztünk.

Az 5. ábra az I. fragmens szintézisének példáján szemlélteti azt az új megközelítési módot, melyet a humán proinzulingén szintézisénél alkalmaztunk, átfedő komplementer oligonukleotidok és PCR-eljárás felhasználásával.

A 6. ábrán a IV. fragmens szintézisének vázlatát láthatjuk (az oligonukleotidokat csak nyilakkal jelöltük).

A 7. ábrán a II., III. és V. fragmens szintézisének vázlatát láthatjuk (az oligonukleotidokat csak nyilakkal jelöltük).

A 8. ábrán a pPZG301-, pPZG302-, pPZG303-, pPZG304- és pPZG305-jelű plazmidok előállításának vázlatát láthatjuk.

A 9. ábrán a pPZG311- és pPZG312-jelű plazmidok előállításának vázlatát láthatjuk.

A 10. ábrán a I. típusú expressziós egység bejuttatására alkalmas fonalas gombákban működőképes expressziós vektor előállításának vázlatát láthatjuk.

A 11. ábrán a II. típusú expressziós egység bejuttatására alkalmas fonalas gombákban működőképes expressziós vektor előállításának vázlatát láthatjuk.

A 12. ábrán a *glaA*-gén GlaG2 kapcsolódási régiójának szekvenciáját láthatjuk.

1. példa

A humán proinzulingén és az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns gén szintézise átfedő oligonukleotidok és polimeráz-láncreakció (PCR) alkalmazásával

a) Módszerek

A DNS-manipulációs kísérleteket szokásos molekuláris biológiai eljárások alkalmazásával végeztük, melyeknek leírása megtalálható Maniatis, T., és mtsai. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" című kézikönyvében [Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., (1982)].

Az alkalmazott vegyszerek, enzimek és plazmidok, hacsak másként nem jelezzük, különböző kereskedelmi forrásokból beszerezhetők. A restrikciós endonukleázos emésztések esetén a gyártó által ajánlott puffereket és reakciókörülményeket alkalmaztuk, hacsak másként nem jeleztük.

Az alkalmazott oligonukleotidok szintézisét az "ISOGEN Bioscience", Amszterdam, Hollandia, végezte, megrendelésünk alapján. A gyártó cég a DNS-mintákat liofilizált formában, nátriumsóként szolgáltatta, az oligonukleotidok 5'- és 3'-végükön szabad hidroxilcsoportokat tartalmaztak. A DNS-mintákat steril MQ-vízben oldottuk fel. Az egyláncú DNS-oligonukleotidok koncentrációját abszorbancia-méréssel (A_{260}) határoztuk meg. A feloldott DNS-oligonukleotidokat -20 °C-on tároltuk.

A polimeráz-láncreakciós (továbbiakban PCR) kísérleteket Perkin Elmer Cetus (761 Main Ave., Norwalk CT 06859) készülékben, "GeneAmp™" DNS amplifikációs reagenskészlet és "ampliTaq™" rekombináns taq-DNS-polimeráz alkalmazásával hajtottuk végre. A törzsoldatokat és a reakcióelegyeket a "Perkin Elmer Cetus Protocol for DNA

Amplification" kiadványban leírtak szerint, a gyártó ajánlása szerint állítottuk elő, azzal az eltéréssel, hogy a reakcióelegyekben templát-DNS nem volt, csak oligonukleotidok, egyenként 100 pmól/l koncentrációban (reakciótérfogat: 100 µl). A PCR-reakciókban a következő hőmérsékletciklusokat alkalmaztuk: szálak szétválasztása: 94 °C, 1 perc, hibridizáció: 40 °C, 1 perc (az 1. és 4. fragmens esetén) vagy 50 °C, 1 perc (a 2., a 3. és 5. fragmens esetén), polimerizáció: 72 °C, 1 perc. 25 ciklust hajtottunk végre. Az utolsó ciklus befejeztével a polimerizáció idejét 7 perccel megnyújtottuk, valamennyi lánc polimerizációjának teljessé tétele céljából. A reakcióelegyet ezután 4 °C-ra hűtöttük. A PCR-termékeket a reakcióelegyből két lépésben végrehajtott kloroformos extrakcióval izoláltuk, a DNS-t ezután izopropanollal kicsaptuk, a csapadékot vákumban megszárítottuk, majd 50 µl TE-pufferben feloldottuk.

A transzformációs és plazmidamplifikációs kísérletekben az *E. coli K12* baktérium JM109-jelű törzsét alkalmaztuk [Yanisch-Perron és mtsai.: Gene 33, 103 (1985)]. Az *Escherichia coli* sejtek transzformálását és elektroporációját a szakirodalomban megtalálható eljárások szerint végeztük [Hanahan, D.J.: Mol. Biol. 166, 557 (1983); "Biorad Genepulser" berendezés alkalmazásával].

Az oligonukleotidok tervezése

A szintetikus humán proinzulingén szekvenciáját a humán inzulingén közzétett szekvenciája alapján terveztük [Bell és mtsai.: Nature 284, 26 (1980)]. Rá kell mutatnunk, hogy a gén szintézise során bizonyos módosításokat végre lehet hajtani: lehetséges eltérő kódonokat használni, a legtöbb esetben előnyös kódonokat, be lehet építeni további funkcionális DNS-

szekvenciákat, valamint az expressziós vektorokba történő ligálást elősegítő restrikciós helyeket, meg lehet változtatni a kódoló régió egy vagy több kódonját, olyan módosított polipeptid előállítása céljából, mely lényegében azonos aktivitással és hasznosíthatósággal bír.

A találmány szerinti megoldásban a szintetikus humán proinzulingént gombákban történő expresszió céljára módosítottuk. A szintézis során az *A. niger* fonalas gombafaj glükoamiláz-G1-génjében leggyakrabban használt kódonokat alkalmaztuk. Az említett gén terméke az említett gombában nagy mennyiségben termelődik [Boel és mtsai.: EMBO J., 3, 1097 (1984); Nunberg és mtsai.: Mol. Cell. Biol., 4, 2306 (1984)]. Az alkalmazott kódonokat a legtöbb esetben megegyeztek a humán kódonokkal, kivéve azokat a régiókat, ahol az előnyös kódonok alkalmazása C és G nukleotidokban túlzottan gazdag oligonukleotidokat eredményezett volna, ami a szekvenálás és talán még a PCR-reakciók végrehajtása során is problémákat okozhatott volna. Ezért bizonyos kódonokat megváltoztattunk, főképp a gli-kódonokat cseréltük GGC-ről GGT-re, ami az *A. niger* fonalas gombafajt glüamilázgénjében a második legkedveltebb Gly-kódon (1. ábra).

A szintetikus proinzulingén 5'-végére egy további DNS-szekvenciát építettünk be, amely a glükoamilázgén (glaA) szignálpeptidének 18 aminosavát, vagy a glaA-propeptid génjének 6 aminosavát kódolta, és Lys-Arg-proteolítikus hasítóhelyet tartalmazott, abból a célból, hogy lehetővé tegyük két különböző típusú expressziós egység előállítását. Az első esetben (I) a szintetikus humán proinzulingén a glükoamiláz promóter (p_{glaA}) és szignálszekvencia (ss_{glaA}) szabályozása alatt állt, a második esetben (II) pedig a proinzulingént az *A. niger* fonalas gombafaj teljes glaA-génjével fuzio-

náltattuk, egy távtartó peptiden keresztül, amely tartalmazott egy KEX-2-szerű fehérjefeldolgozása szignált, és a konstrukció a p_{glaA}-promóter szabályozása alatt állt (2. ábra).

Előállítottunk egy mutáns szintetikus humán proinzulingént is, amely N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazott, az N-glikozilálási szekvencia expresszió és szekréció mértékére gyakorolt hatásának tanulmányozása céljából. Mivel a C-peptid az inzulin működése szempontjából nem esszenciális, minthogy a szekréciós folyamat során a fehérjéből kihasad, egy mutációt hoztunk létre a humán proinzulingén (BCA) C-peptidet kódoló régiójában. Ily módon előállítottunk egy mutánst (B-Pg-A), amely hordozta az AsnXSer N-glikozilálási konszenzus szekvenciát, az Ala-C20-aminosavat kódoló GCC-kódon Asn-aminosavat kódoló AAC-kódonra történő változtatása útján (2. ábra).

A humán proinzulingén szintézisét egy új eljárás szerint végeztük, átfedő komplementer oligonukleotidok és PCR-eljárás alkalmazásával. Az eljárás alapelve az volt, hogy a PCR-eljárásban két középső átfedő komplementer oligonukleotidot alkalmaztunk, melyek egyidejűleg templátként és láncindítóként is funkcionáltak, ily módon lehetővé téve a Taq DNS polimeráz számára, hogy "megnagyobbítsa" őket, azaz az első ciklus során az oligonukleotidok meghosszabbodtak. A második ciklus során a "megnagyobbított" oligonukleotidok átfedtek a szomszédos 3'- vagy 5'-végi oligonukleotidokkal, és így lehetővé vált, hogy a Taq DNS polimeráz "tovább nagyítsa" a már "megnagyobbított" középső oligonukleotidokat. Az eljárás során tehát a Taq DNS polimeráz valójában betölti a kémiailag szintetizált átfedő oligonukleotidok végei közötti réseket, és ily módon egy ket-

tősszálú DNS keletkezik. A humán proinzulingén és N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutánsa szintézisét PCR-eljárással hajtottuk végre, külön-külön megszintetizált fragmensek alkalmazásával. A gének fragmensekre vágását a C-peptid kódoló régiójában jelenlévő két PstI-hasítóhely jelenléte tette lehetővé (3. ábra). 14 különböző szekvenciájú oligonukleotidot terveztünk: 10 oligonukleotid (B3, B4, B5, B6, C1, C2, C3, A1, A2 és A3) szekvenciáját a humán proinzulin DNS kódoló szekvenciájából származtattuk, az *A. niger* fonalas gombában történő expresszió szempontjából előnyös kódonok alkalmazásával, két oligonukleotidot (B1 és B2) úgy terveztünk, hogy beépítésükkel bejuttathassuk a glaA-gén szignálszekvenciáját valamint olyan restrikciós hasítóhelyeket, melyek lehetővé teszik a génkonstrukció I. típusú expressziós vektorba történő ligálását, egy oligonukleotidot (B7) a glaA- (G2) génszekvencia távtartó-régiójának és további restrikciós hasítóhelyek bejuttatása céljára terveztünk, mely hasítóhelyek lehetővé teszik a II. típusú expressziós vektorba történő ligálást, és terveztünk egy oligonukleotidot (C4) az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát hordozó mutáció bejuttatásának céljára (4. ábra).

b) Az I-V. fragmenseek PCR-szintézise

I. és IV. fragmensek

Az I. és IV. fragmenst "lépésről lépésre" szintetizáltuk meg. Az első PCR-"lépésben" a reakciót a B3 és B4 oligonukleotidok alkalmazásával hajtottuk végre, és így a B3/B4 termék keletkezett. A következő "lépésben" 1 μl B3/B4 terméket a következő oligonukleotidokat tartalmazó PCR-reakcióelegybe kevertünk: a) az I. fragmens létrehozásához szükséges B2 és B5 oligonukleotidok, és b) a IV. fragmens létrehozásához szükséges B7 és

B5 oligonukleotidok. Így állítottuk elő a B2/B3/B4/B5 és B7/B3/B4/B5 termékeket. A harmadik "lépésben" az I. fragmens előállítása céljából a B2/B3/B4/B5 termék valamint a B1 és B6 oligonukleotidok alkalmazásával hajtottunk végre PCR-reakciót, a IV. fragmens előállítása céljából pedig a B7/B3/B4/B5 termékből 1 µl-t kevertünk egy B7 és B6 oligonukleotidokat tartalmazó PCR-reakcióelegybe. Így állítottuk elő a B1/B2/B3/B4/B5/B6 és a B7/B3/B4/B5/B6 termékeket. A kapott termékek mérete megfelelt a várakozásnak, és a PCR-termékeket a megfelelő restrikciós enzimekkel megemésztve megkaptuk az I. és IV. fragmenst (5. és 6. ábra).

A II., III. és V. fragmensek előállítása

A II., III. és V. fragmenst egy "lépésben" szintetizáltuk meg. A PCR-reakciókat a következő oligonukleotidok alkalmazásával hajtottuk végre: a) C1, C2, C3; b) A1, A2, A3; és c) C1, C4, C3. A kapott PCR-termékek - C1/C2/C3, A1/A2/A3 és C1/C4/C3 - mérete megfelelt a várakozásnak, majd a termékeket megfelelő restrikciós enzimekkel megemésztve kaptuk meg a II., III. és V. fragmenst (7. ábra).

A PCR-szintetizált fragmensek pUC19-vektorba történő klónozása és DNS-szekvencia analízise

A pUC19-plazmidot a következő restrikciós enzimekkel emésztettük: a) PstI, b) PstI/EcoRI, és c) PstI/SalI, majd az emésztett plazmidokat a megfelelő fragmenssel (I-V) összeligáltuk, mely eljárás eredményeképp a következő plazmidokat kaptuk: pPZG301, pPZG302, pPZG303, pPZG304 és pPZG305 (8. ábra). A kialakított plazmidokkal *E. coli* JM109-sejteket transzformáltunk. A kapott transzformánsokból plazmid DNS-t izoláltunk, "mini-prep" eljárás alkalmazásával, és az izolált plazmid DNS-eket restrik-

ciós enzimes emésztéssel analizáltuk. A megfelelő plazmidokat tartalmazó *E. coli* transzformánsokat tenyésztettük, plazmid DNS-üket "QIAGEN typ 20" oszlop alkalmazásával izoláltuk, és "SEQUENASE® Version 2.0" reagenskészlet alkalmazásával szekvenáltuk. A további konstrukciók kialakításához a megfelelően szintetizált és inszertált szekvenciákat tartalmazó vektorokat használtuk.

A pPZG311- és pPZG312-plazmidok előállítása

A teljes humán proinzulingént, valamint az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns gént a glaA-gén szignálszekvenciájával együtt tartalmazó vektorokat a következők szerint állítottuk elő: a pPZG311-plazmidot úgy állítottuk elő, hogy a pPZG301-plazmidból izolált 173 bázispáros EcoRI/PstI-fragmenst, a pPZG302-plazmidból izolált 75 bázispáros PstI-fragmenst, valamint a pPZG303-plazmidból izolált PstI-SalI-fragmenst az EcoRI/SalI-emésztett pUC19-vektorba ligáltuk. A pPZG312-plazmidot úgy állítottuk elő, hogy a pPZG301-plazmidból izolált 173 bázispáros EcoRI/PstI-fragmenst, a pPZG305-plazmidból izolált 75 bázispáros PstI/PstI-fragmenst, valamint a pPGZ303-plazmidból izolált 74 bázispáros PstI/SalI-fragmenst az EcoRI/SalI-emésztett pUC19-vektorba ligáltuk (9. ábra).

2. példa

Fonalas gombákban alkalmazható expressziós vektorok előállítása

I. Az I. típusú expressziós egység előállítása

A pAN52-7NotBCA- és pAN52-7NotBPgA-plazmidok előállítása

A pAN52-7NotuidA-plazmidot [Verdoes és mtsai., Gene (1994) nyomtatás alatt] részlegesen megemésztettük NcoI és SalI enzimekkel. Izoláltuk a glaA-promótert és a trpC-gén terminációs régióját hordozó 7,55 kb-os SalI/NcoI-fragmenst, és egyrészt összeligáltuk a pPZG311-plazmidból izolált 317 bázispáros Nco/SalI-fragmenssel, ily módon kialakítva a pAN52-7NotBCA-plazmidot, másrészt pedig összeligáltuk a pPZG312-plazmidból izolált 317 bázispáros NcoI/SalI-fragmenssel, és így kialakítottuk a pAN52-7NotBPgA-plazmidot (10. ábra).

A pAN52-7BCAamdS- és a pAN52-7BPgAamdS-plazmidok előállítása

Az *A. nidulans* acetamidáz génjét (amdS) hordozó 5.0 kb-os NotI-fragmenst beligáltuk egyrészt a pAN52-7NotBCA-plazmid másrészt pedig a pAN52-7BPgA-plazmid NotI-helyére, és így megkaptuk a pAN52-7BCAamdS- valamint a pAN52-7BPgAamdS-plazmidokat (10. ábra).

II. A II. típusú expressziós egység előállítása

A pAN56-7BCAamdS- és a pAN56-7BPgAamds-plazmidok előállítása

A fuzionált glükoamiláz-proinzulin-fehérjét és az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns glükoamilált-proinzulin-fehérjét kódoló szekvenciákat hordozó vektorokat a következők szerint állítottuk elő: a pPZG304-plazmidot megemésztettük EcoRV és AlwNI restrikciós enzimekkel. A 25 bázispáros EcoR5/AlwNI-fragmenst, amely a 6 aminosav hosszúságú távtartó-régiót kódoló szekvenciát hordozta, összeligáltuk a

pAN56-7-plazmidból származó 3.07 kb-os SalI/EcoRV-fragmenssel, amely a gla(G2)-gént hordozta, és így előállítottuk a SalI/AlwNI-fragmenst. A pAN56-7-plazmidot a pAN56-4-plazmidból állítottuk elő [Broekhuijsen és mtsai.: J. Biotech., 31, 135 (1993)], oly módon, hogy a gpdA promótert kicseréltük a pAN52-7-plazmid 4.2 kb-os NotI/NcoI-fragmensével, amely a glaA-promótert hordozta, és az interleukingént eltávolítottuk, és így a plazmidban a GlaG2-géntől 5'-irányban egy EcoRV hasítási hely keletkezett. Az AlwNI/SalI-fragmenst ezután összeligáltuk a pAB1-6S-plazmidból [Den Herder és mtsai.: Mol. Gen. Genet. 233, 404 (1992)] származó 10.6 kb-os HindIII/SalI-fragmenssel, amely tartalmazta a GlaA promótert és az amdS-gént, valamint az említett fragmensekhez ligáltuk még a pAN52-7BCA-plazmid a) 1.06 kb-os AlwNI/HindIII-fragmensét, így kialakítva a pAN56-7BCA amdS-plazmidot és b) a pAN52-7BPgA-plazmid 1.06 kb-os AlwNI/HindIII-fragmensét, ily módon kialakítva a pAN52-7BPgAamdS-plazmidot (11. ábra). A távtartó-régióban található egy kétszeresen bázisos Lys-Arg-hasítóhely. A glükoamilázgén humán proinzulingénnel (BCA) és proinzulin mutáns génnel (BPgA) kialakított fúziós fehérjéinek fúzióhelye körüli szekvenciáját a távtartó-régió szekvenciájával együtt a 12. ábrán láthatjuk.

3. példa

Az *Aspergilus niger* fonalas gomba transzformációja

Az *Aspergilus niger* fonalas gombafaj transzformációját a szakirodalomban megtalálható eljárások szerint hajtottuk végre [Goosen és mtsai.:

Curr. Genet. 11, 499 (1987); Kelly és Hynes, Embo J. 4, 475 (1985); Van Hartingsveldt és mtsai.: Mol. Gen. Genet. 206, 71 (1987)].

Az *A. niger* N402 fonalas gombafajt [Bos, C.J. és mtsai.: Curr. Genet. 14, 437 (1988)] a pAN52-7BCAamdS, a pAN52-7BPgAamdS, a pAN56-7BCAamdS és a pAN56-7BPgAamdS expressziós vektorokkal transzformáltuk. A transzformáns kolóniákat olyan táptalajon szelektáltuk, amely egyedüli nitrogénforrásként acetamidot vagy akrilamidot tartalmazott. A transzformánsokat tovább analizáltuk, minden esetben egyetlen spórából kiindulva.

4. példa

Humán inzulin szekréciója a táptalajban

1. Humán proinzulingént és N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó mutáns gént hordozó *A. niger* transzformánsok tenyésztése

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba, melyek 100 ml folyékony táptalajt tartalmaztak, a kiválasztott transzformánsokból kb. 10^8-10^8 spórát oltottunk le. A táptalaj összetétele a következő volt: 70 mmól/l $NaNO_3$, 7 mmól/l KCl, 11 mmól/l KH_2PO_4, 2 mmól $MgSO_4$, 4 % dextrin, nyomelemek (1:1000; 76 mmól/l $ZnSO_4$, 178 mmól/l H_3BO_3, 25 mmól/l $MnCl_2$, 18 mmól/l $FeSO_4$, 7.1 mmól/l $CoCl_2$, 6,4 mmól/l $CuSO_4$, 6,2 mmól/l Na_2MoO_4, 176 mmól/l EDTA) és vitaminok (1:1000; 100 mg/l tiamin, 100 mg/l riboflavin, 100 mg/l nikotinamid, 50 mg/l piridoxin, 10 mg/l pantotinsav, 0,2 mg/l biotin). A transzformánsokat 32 °C-on tenyésztettük 36 órán át. A táptalajból mintákat vettünk és megvizsgáltuk azokat inzulin jelenlétére vonatkozóan.

2. Inzulin expresszálása

Az immunreaktív humán inzulin termelődését a "Pharmacia INSULIN RIA 100" reagenskészlet alkalmazásával mutattuk ki (Kabi Pharmacia Diagnostics). A transzformánsok tenyészetét tartalmazó fermentléből mintákat vettünk, a mintákat leszűrtük, a szürleteket semlegesítettük, szükség esetén meghígítottuk, majd RIA- (radioimmunoesszé) meghatározásnak vetettük őket alá [Livessy és mtsai.: Clin. Biochem. 13, 151 (1980)]. Az *A. niger* transzformánsok immunreaktív humán inzulinexpressziós szintjeit (mE/l) az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Az immunreaktív humán inzulin expressziós szintje különböző *A. niger* transzformánsokban

Transzformáns	plazmid	Immunreaktív inzulin (mE/l)
A. niger 7650 [NCAIM (P) F 001215]	PAN52-7BCamdS	0
A. niger 7651 [NCAIM (P) F 001216]	PAN52-7BPgAmdS	2
A. niger 7649 [NCAIM (P) F 001214]	PAN56-7BCAamdS	56
A. niger 7638 [NCAIM (P) F 001213]	PAN56-7BPgAmdS	776

Az *A. niger* 7650, *A. niger* 7651, *A. niger* 7649 és *A. niger* 7638 transzformánsokat letétbe helyeztük az "Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél" (H-1052, Budapest, PF 53, Magyarország) 1994. július 8-án, ahol a törzsek a következő nyilvántartási számot kapták: NCAIM (P) F 001215, NCAIM (P) F001216, NCAIM (P) F 001214

és NCAIM (P) F 001213. A letétbe helyezést a "Budapesti Szerződés" rendelkezéseinek megfelelően (6.1 cikk értelmében) hajtottuk végre.

A táblázatból látható, hogy a különböző vektorokat hordozó transzformánsok expressziós szintjeiben lényeges különbségek mutatkoznak. Messze a legmagasabb expressziós szintet az a transzformáns adta, amelyik az N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmazó humán proinzulingént a glukoamiláz-fehérjével fuzionáltatva tartalmazó vektorral volt transzformálva.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. DNS-szekvencia, amely B-Pg-A képletű inzulinprekurzort kódol, ahol B és A sorrendben a humán inzulin B- és A-láncát jelöli, Pg pedig módosított C-peptidet jelöl, vagy akárhány aminosavat, melyek legalább egy N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmaznak, és Pg a B- és A-láncokat proteolítikus hasítóhelyeken vagy specifikus kémiai hasítóhelyeken keresztül köti össze.

2. DNS-szekvencia, amely B(29)-Pg-A képletű inzulinprekurzort kódol, ahol B(29) a B(1-29)-láncot, A az A-láncot jelöli, a Pg pedig módosított C-peptidet jelöl, vagy akárhány aminosavat, melyek legalább egy N-glikozilálási konszenzus szekvenciát tartalmaznak, és Pg a B- és A-láncokat proteolítikus hasítóhelyeken vagy specifikus kémiai hasítóhelyeken keresztül köti össze.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS-szekvencia, amely egy bizonyos gazdaszervezetben történő expresszió szempontjából előnyös kódonokat tartalmaz.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia, amely egy proteolítikus hasítóhelyet vagy specifikus kémiai hasítóhelyet tartalmazó távtartó-régión keresztül fuzionáltatva van egy védőfehérje génjével.

5. DNS-szekvencia, amely olyan gyógyászatilag jelentős peptidet vagy proteint kódol, melynek valamely távtartó-régiójában egy nem esszenciális helyre N-glikozilálási konszenzus szekvencia van bejuttatva.

6. Transzformált gazdasejtek, melyek az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvenciát tartalmazzák.

7. Transzformált gombasejtek, melyek az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvenciát tartalmazzák.

8. Transzformált *Aspergillus* fajhoz tartozó gombasejtek, melyek az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvenciát tartalmazzák.

9. Transzformált sejtek, melyek 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szegmenst tartalmaznak.

10. Transzformált gombasejtek, melyek 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szegmenst tartalmaznak.

11. Transzformált *Aspergillus* fajhoz tartozó gombasejtek, melyek 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szegmenst tartalmaznak.

12. Eljárás inzulin előállítására, alkalmas gazdasejtek - előnyösen gombasejtek - tenyésztése útján, *azzal jellemezve*, hogy gazdasejtként az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvenciát hordozó vektorral transzformált sejteket alkalmazunk.

13. Eljárás gógyászatilag alkalmazható peptidek vagy fehérjék előállítására, alkalmas gazdasejtek - előnyösen gombasejtek - tenyésztése útján, *azzal jellemezve*, hogy gazdasejtként 5. igénypont szerinti DNS-szekvenciát hordozó vektorral transzformált sejtet alkalmazunk.

22 old.
13 rajz
35 dd.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
46.

B-lánc

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
TTT	GTG	AAC	CAA	CAC	CTG	TGC	GGC	TCA	CAC	CTG	GTG	GAA	GCT	CTC	TAC
X			X					X				X			
TTC	GTG	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCC	CAC	CTG	GTG	GAG	GCT	CTC	TAC

Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Arg	Arg
CTA	GTG	TGC	GGG	GAA	CGA	GGC	TTC	TTC	TAC	ACA	CCC	AAG	ACC	CGC	CGG
X			X	X	X	X				X			X	X	X
CTG	GTG	TGC	GGT	GAG	CGC	GGT	TTC	TTC	TAC	ACC	CCC	AAG	ACT	CGT	CGC

C-lánc

Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Gly	Gln	Val	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro
GAG	GCA	GAG	GAC	CTG	CAG	GTG	GGG	CAG	GTG	GAG	CTG	GGC	GGG	GGC	CCT
	X						X					X	X	X	X
GAG	GCT	GAG	GAC	CTG	CAG	GTG	GGC	CAG	GTG	GAG	CTG	GGT	GGT	GGT	CCC

	(Asn)														
Gly	Ala	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Leu	Glu	Gly	Ser	Leu	Gln	Lys
GGT	GCA	GGC	AGC	CTG	CAG	CCC	TTG	GCC	CTG	GAG	GGG	TCC	CTG	CAG	AAG
	X			X			X				X				
GGT	GCC	GGC	AGC	CTC	CAG	CCC	CTG	GCC	CTG	GAG	GGC	TCC	CTG	CAG	AAG
	(AAC)														

A-lánc

Arg	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln
CGT	GGC	ATT	GTG	GAA	CAA	TGC	TGT	ACC	AGC	ATC	TGC	TCC	CTC	TAC	CAG
X		X		X	X		X		XX						
CGC	GGC	ATC	GTG	GAG	CAG	TGC	TGC	ACC	TCC	ATC	TGC	TCC	CTC	TAC	CAG

Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	[End]
CTG	GAG	AAC	TAC	TGC	AAC	TAG

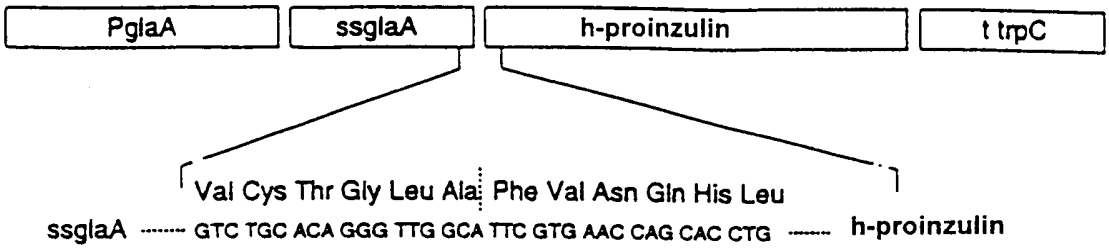
CTG GAG AAC TAC TGC AAC TAG

1. ábra

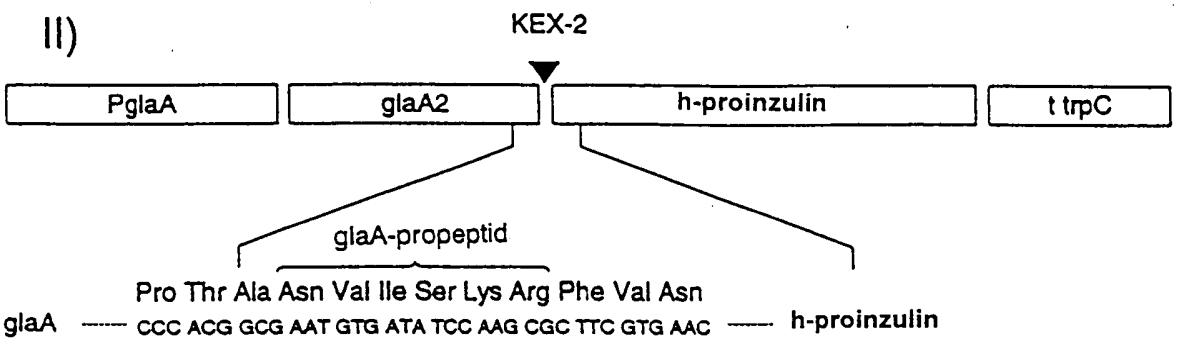
Felső nukleotid szekvencia természetes humán inzulint kódoló szekvencia.
Alsó nukleotid szekvencia optimalizált kódon-használatú szintetikus, humán inzulint kódoló szekvencia.
Félkövér betűk: a humán inzulin A- és B-lánca.
X: az Aspergillus által kedvelt kódonok használatából fakadó változások.
A ( ) az AsnXSer N-glikozilációs konszenzus szekvenciát kialakító bejuttatott mutációt jelöli.

Két humán proinzulin expressziós egység

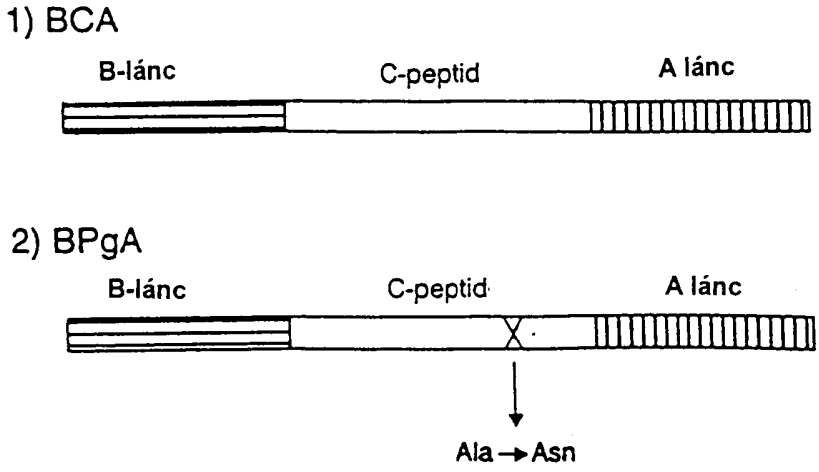
I)



II)

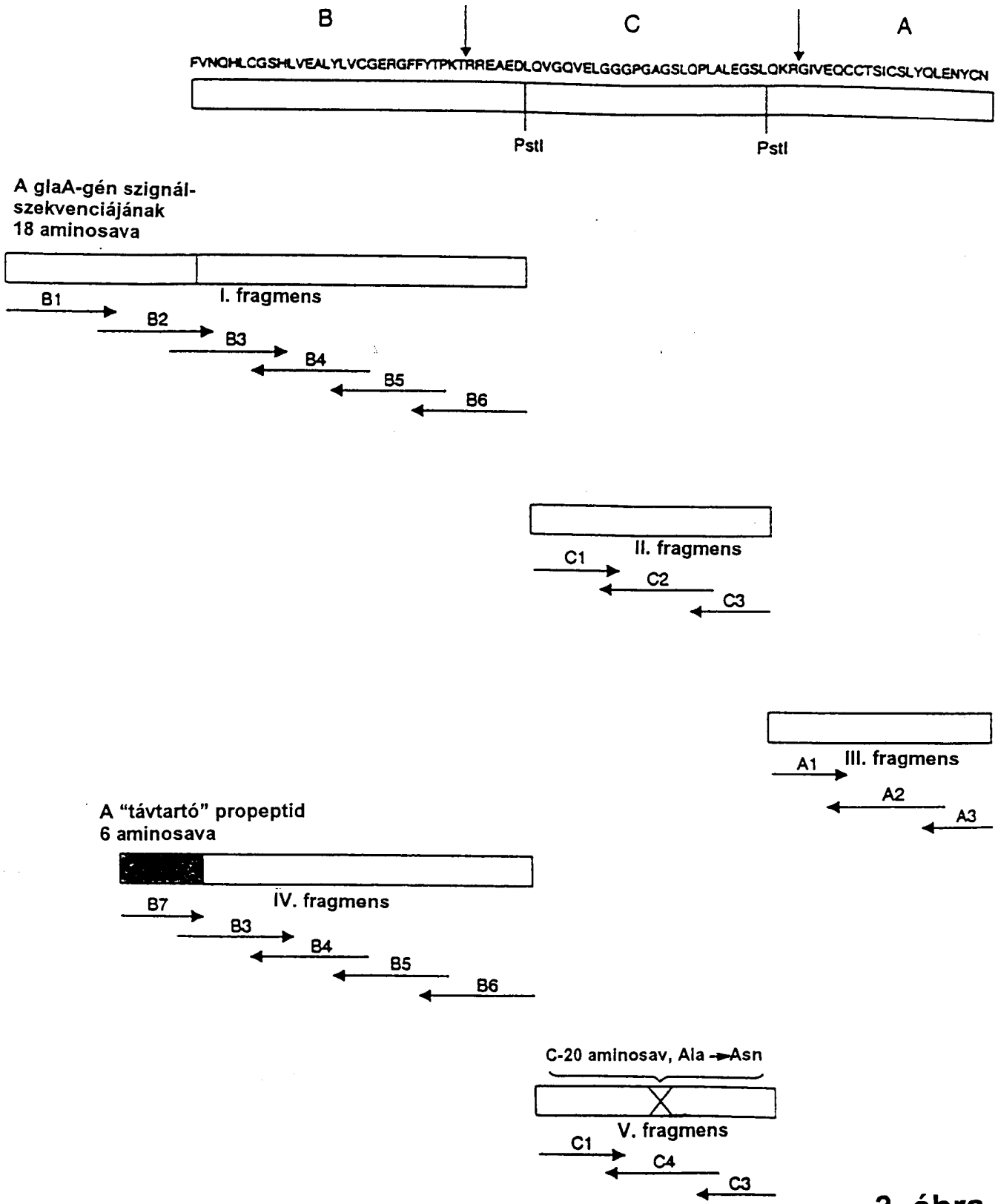


A humán proinzulingén és N-glikozilációs konszenzus szekvenciát hordozó mutánsának vázlatos ábrázolása



2. ábra

Oligonukleotid-tervezési stratégia



3. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

B1-oligonukleotid: 43 tagú

Met

5'-CCGGAATTCC ATGGCGTTCC GATCTCTACT CGCCCTGAGC GGC-3'

EcoRI NcoI

B2-oligonukleotid: 41 tagú

5'-CCTGAGCGGC CTCGTCTGCA CAGGGTTGGC ATTCGTGAAC C-3'

B3-oligonukleotid: 38 tagú

5'-TTCGTGAACC AGCACCTGTG CGGCTCCCAC CTGGTGGA-3'

AlwNI

B4-oligonukleotid: 36 tagú

5'-GCTCACCGCA CACCAGGTAG AGAGCCTCCA CCAGGT-3'

B5-oligonukleotid: 36 tagú

5'-AGTCTTGGGG GTGTAGAAGA AACCGCGCTC ACCGCA-3'

B6-oligonukleotid: 40 tagú

5'-GGAATTCTGC AGGTCCTCAG CCTCGCGACG AGTCTTGGGG-3'

EcoRI PstI

B7-oligonukleotid: 32 tagú

5'-CCGGAATTCG ATATCCAAGC GCTTCGTGAA CC-3'

EcoRI EcoRV

C1-oligonukleotid: 41 tagú

5'-GGAATTCTGC AGGTGGGCCA GGTGGAGCTG GGTGGTGGTC C-3'

EcoRI PstI

C2-oligonukleotid: 33 tagú

5'-GGGGCTGGAG GCTGCCGGCA CCGGGACCAC CAC-3'

NaeI

C3-oligonukleotid: 39 tagú

5'-GGAATTCTGC AGGGAGCCCT CCAGGGCCAG GGGCTGGAG-3'

EcoRI PstI

C4-oligonukleotid: 33 tagú Asn

5'-GGGGCTGGAG GCTGCCGTTA CCGGGACCAC CAC-3'

A1-oligonukleotid: 41 tagú

5'-GGAATTCTGC AGAAGCGCGG CATCGTGGAG CAGTGCTGCA C-3'

EcoRI PstI

A2-oligonukleotid: 40 tagú

5'-TTCTCCAGCT GGTAGAGGGA GCAGATGGAG GTGCAGCACT-3'

A3-oligonukleotid: 42 tagú Stop

5'-GGAATTCGGA TCCGTCGACC TAGTTGCAGT AGTTCTCCAG CT-3'

EcoRI BamHI SalI

- - - restrikciós endonukleáz hasítóhelyek

—— a transzláció kezdetét (Met) és befejezését (Stop) mutató jel

⁀ az Ala→Asn mutációt mutató jel, mely mutáció a C4-oligonukleotidban a NaeI-hely megszűnését okozta

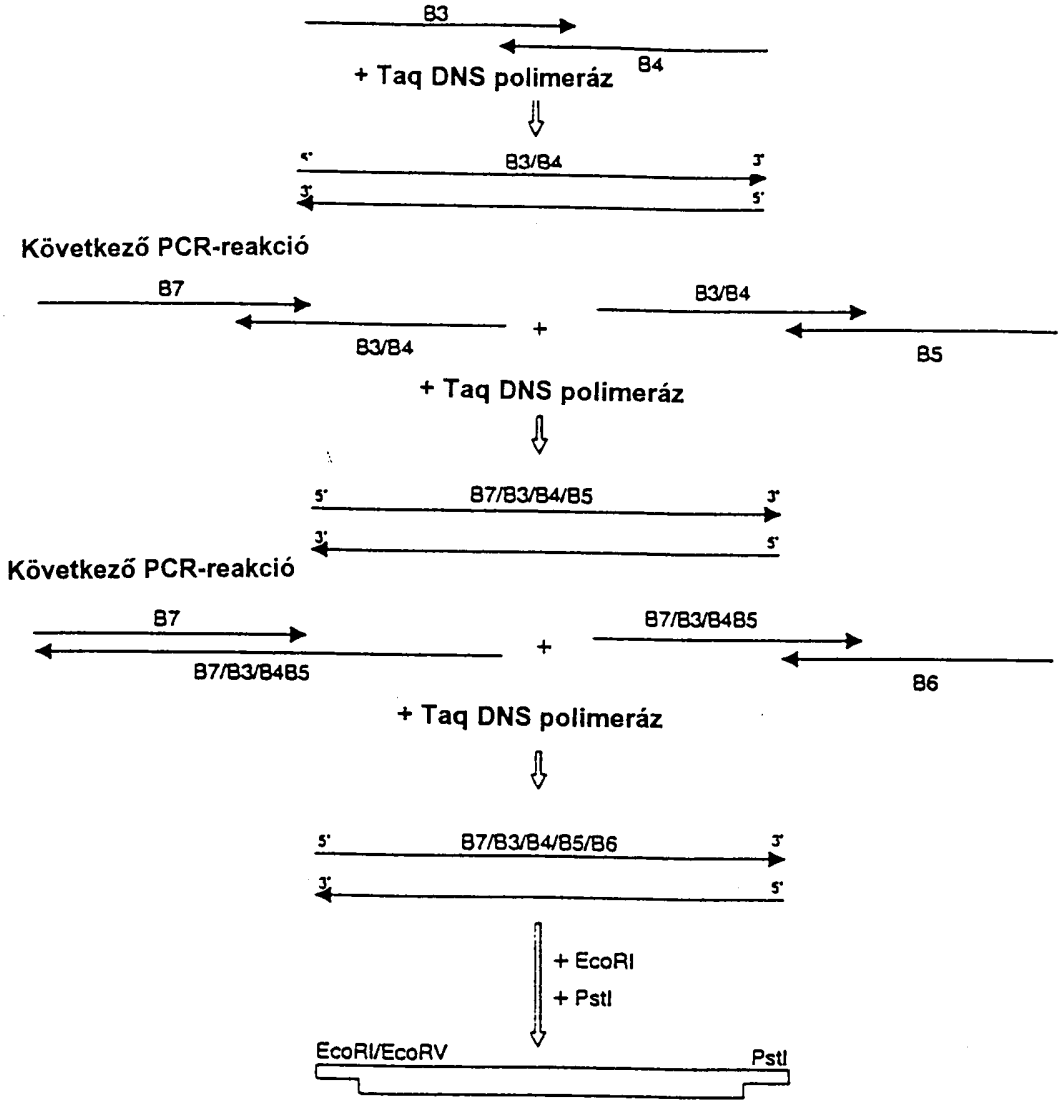
4. ábra

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

5. ábra

5. ábra folytatása

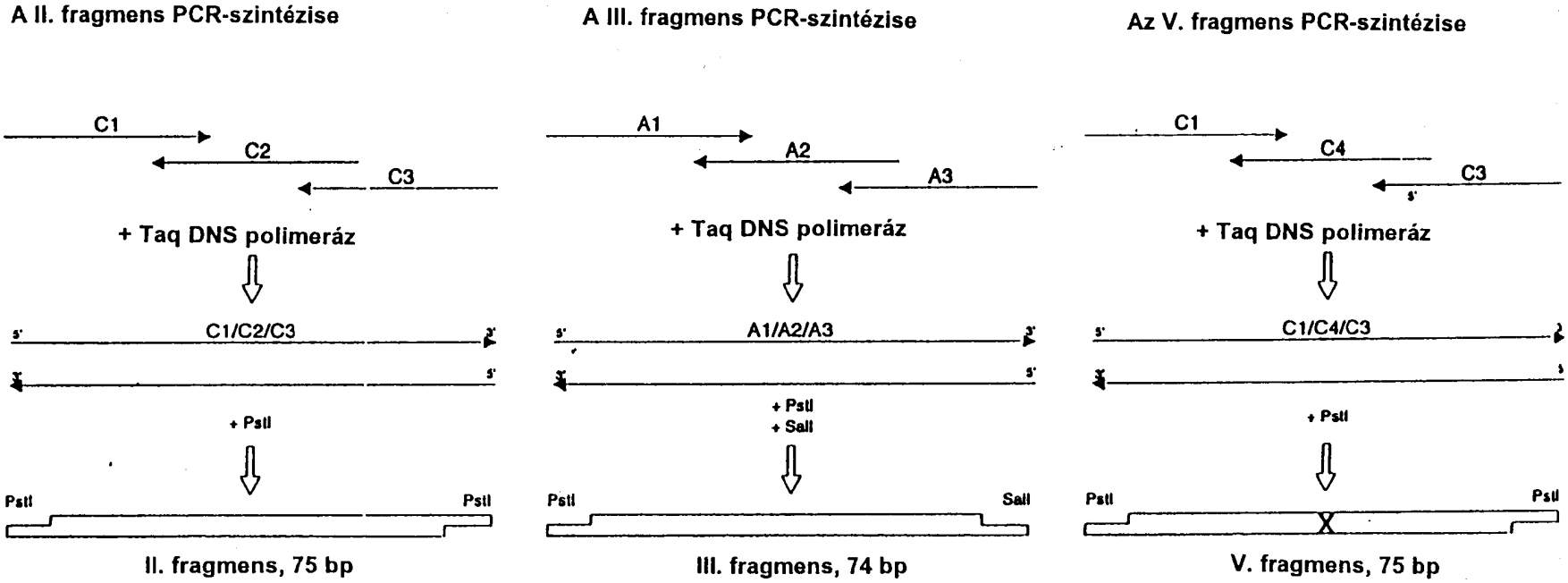
A IV. fragmens PCR-szintézise



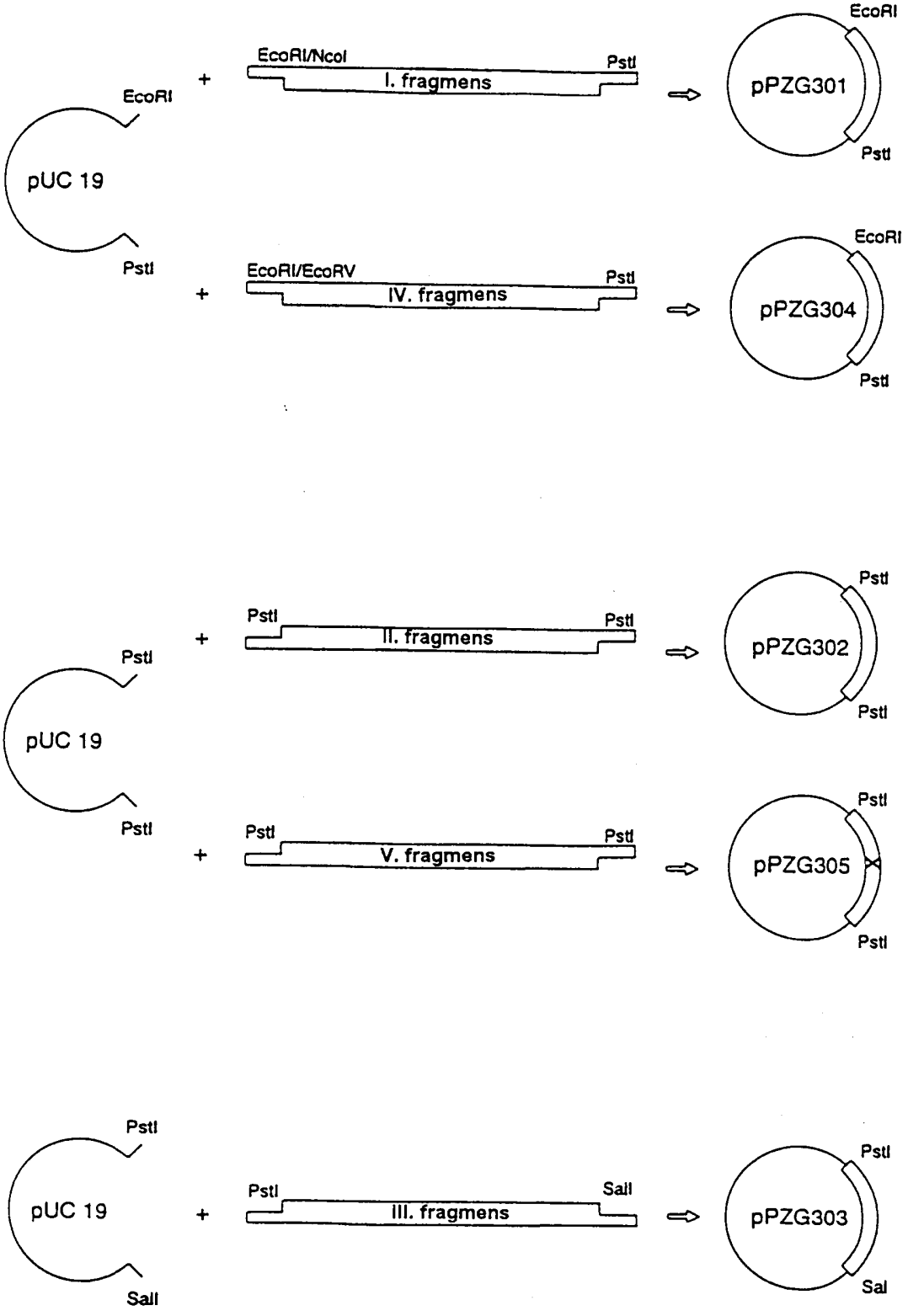
IV. fragmens, 131 bp

6. ábra

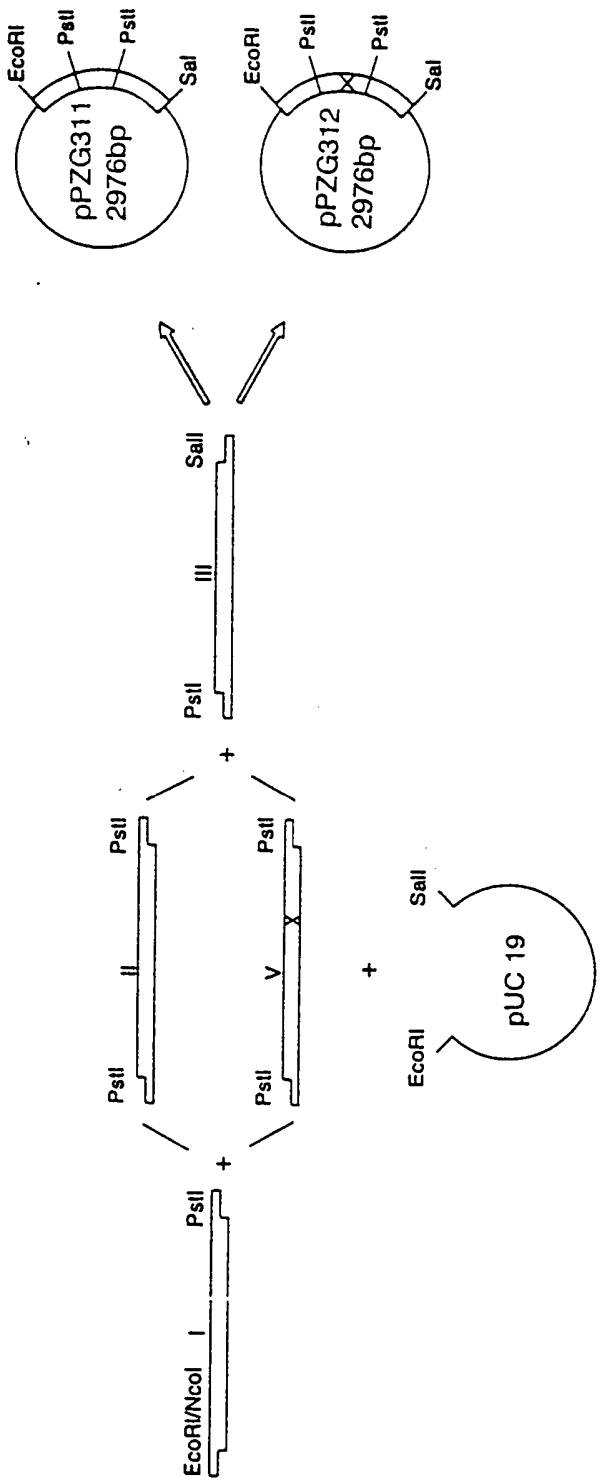
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



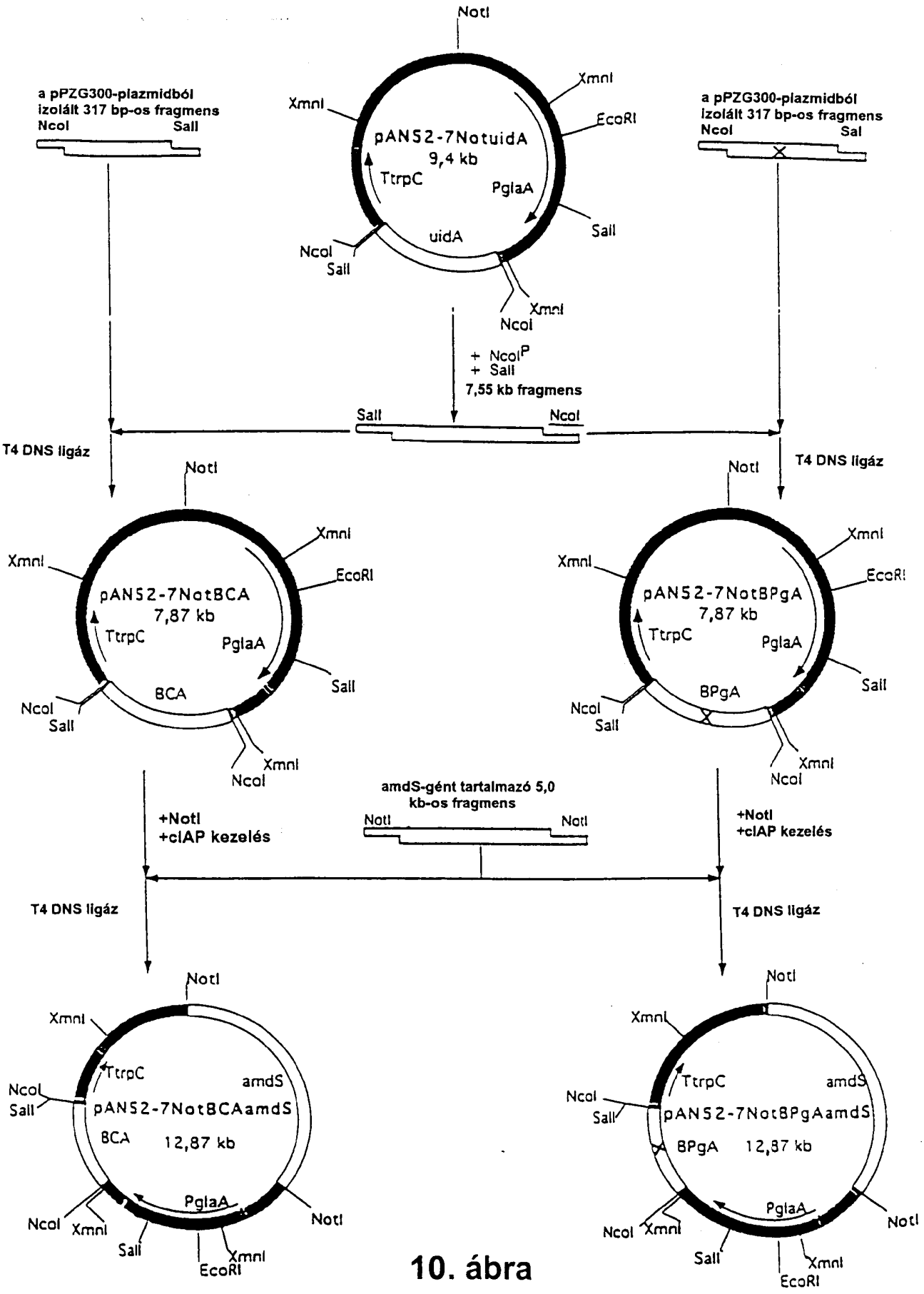
7. ábra


EcoRI
pUC 19
PstI
+
EcoRI/NcoI
I. fragmens
PstI
pPZG301
EcoRI
PstI
+
EcoRI/EcoRV
IV. fragmens
PstI
pPZG304
EcoRI
PstI
PstI
pUC 19
PstI
+
PstI
II. fragmens
PstI
pPZG302
PstI
PstI
+
PstI
V. fragmens
PstI
pPZG305
PstI
PstI
pUC 19
SalI
+
PstI
III. fragmens
SalI
pPZG303
PstI
Sal

8. ábra


EcoRI
PstI
PstI
SalI
pPZG311
2976bp
EcoRI
PstI
PstI
SalI
pPZG312
2976bp
SalI
III
PstI
+
PstI
II
PstI
PstI
V
PstI
+
SalI
pUC 19
EcoRI
+
PstI
I
EcoRI/NcoI

9. ábra


NotI
XmnI
EcoRI
pAN52-7NotuidA
9,4 kb
TtrpC
PglaA
uidA
SalI
NcoI
a pPZG300-plazmidból
izolált 317 bp-os fragmens
NcoI SalI
+ NcoI^P
+ SalI
7,55 kb fragmens
T4 DNS ligáz
pAN52-7NotBCA
7,87 kb
BCA
pAN52-7NotBPgA
7,87 kb
BPgA
amdS-gént tartalmazó 5,0
kb-os fragmens
+NotI
+cIAP kezelés
amdS
pAN52-7NotBCAamdS
12,87 kb
pAN52-7NotBPgAamdS
12,87 kb

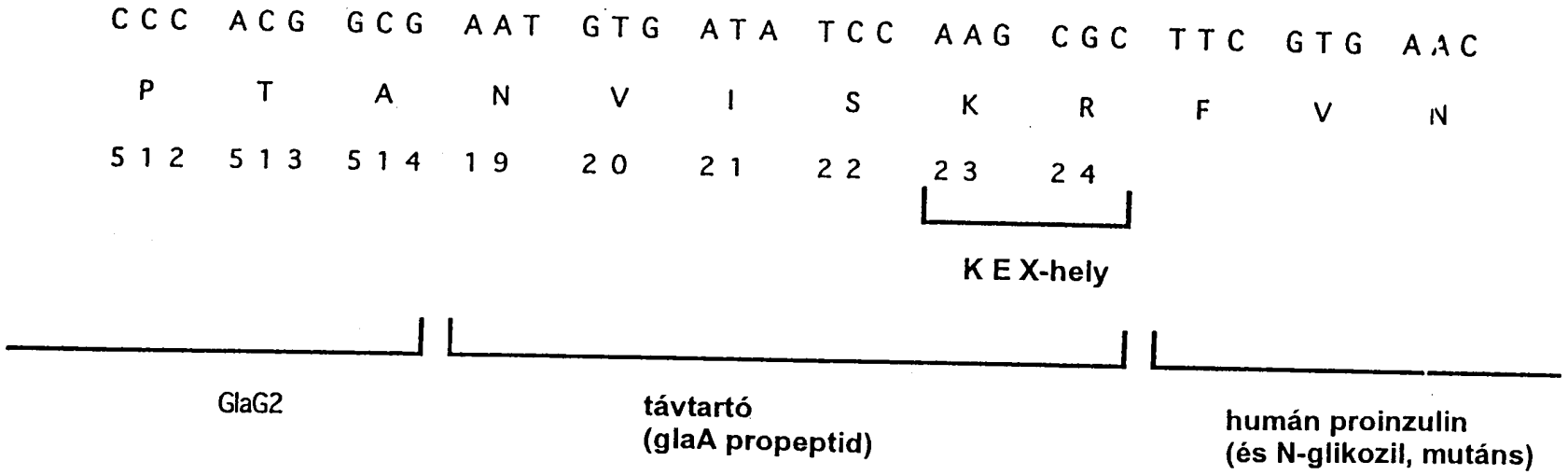
10. ábra

pAN56-7BCAamdS
14,75 Kb
PglaA
amdS
glaA
pUC
TtrpC
BCA
NotI
SalI
HindIII
AlwNI
EcoRV
pAN56-7BPgAamdS
BPgA
pAN52-7NotBCA
+ HindIII
+ AlwNI^P
egy 1,06 kb-os fragmens
pAN52-7NotBPgA
pPZG304
+ AlwNI
+ EcoRV
Izolált 25 kb-os fragmens
pAN56-7
+ EcoRV
+ SalI
Izolált 3,07 kb-os fragmens
EcoRV GAT
CTA
AlwNI
ATCCAAGCGCTTCGTGAACCAGCAC
TAGGTTCGCGAAGCACTTGGTC
egy 10,6 kb-os fragmens
+ SalI
+ HindIII
pAB1-6S
*nem egyedi hasítóhely

11. ábra

P95 02318
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

pAN56-7BCamdS és pAN56-7BPgAamdS



12. ábra