B 5117

REKOMBINÁNS HUMÁN SZÉRUMALBUMIN ELŐÁLLÍTÁSA

Doktori értekezés

Horváth Éva

Szeged

1992

TARTALOMJEGYZÉK

Irodalmi áttekintés 1

Idegen gének expressziója és szekréciója baktériumokkal 3

Idegen gének expressziója és szekréciója élesztővel 4

Célkitűzés 11

1.táblázat 13

2. táblázat 14

Anyagok és módszerek

1. *Escherichia coli* baktérimtörzsek 21
2. *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek 21
3. Tápoldatok és táptalajok baktériumok tenyésztéséhez 21
4. Antibiotikumok 22
5. Tápoldatok és táptalajok élesztősejtek tenyésztéséhez 22
6. Minimál tápoldatok és táptalajok kiegészítéséhez használt aminosavak 22
7. Klónozáshoz használt enzimek 22
8. Plazmid-DNS-izolálás nagy mennyiségben 23
9. Plazmid-DNS-izolálás kis mennyiségben 24
10. Kromoszóma- és plazmid-DNS-izolálás élesztőből 25
11. DNS mólsúly szerinti elválasztása agarózgél-elektroforézissel 26
12. Sanger-féle didezoxi-terminációs DNS-szekvenálás 26
13. Baktériumtranszformálás 31
14. Élesztőtranszformálás plazmid-DNS-sel 32
15. Plazmidstabilitás vizsgálata rekombináns élesztősejtekben 34
16. A *PHO5*-promóter indukciója a promótert tartalmazó expressziós vektorral transzformált rekombináns élesztősejtek tenyésztésekor 34
17. Rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* sejttenyészetből nyert sejtfelülúszó tisztítása immuno(Western)-blot-analízishez 35
18. Élesztősejtek feltárása ELISA-teszthez 35
19. rHSA (fehérjeantigén) tisztítása sejtfelülúszóból immunaffinitás-kromatográfiával 35
20. Fehérjék mólsúly szerinti elválasztása SDS-poliakriamidgél-elektroforézissel (SDS-PAGE) 36
21. Immuno(Western)-blot-analízis 38
22. ELISA (Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay) 39
23. Northern-blot-analízis 40
24. Fehérjetérképezés; HSA hasítása cianogén-bromiddal (CNBr) 42

25. HSA termelése Bioflo IIc (New Brunswick) típusú laboratóriumi fermentorban 42

Eredmények

1. A szintetikus úton előállított *HSA*-gént hordozó expressziós vektor konstrukciója 44
2. HSA-expressziós vektorral transzformált rekombináns élesztő vizsgálata 47
3. Hatékonyabb HSA-expressziós kazetta kialakítása, mely a *GAPDH*-promótert és a pre-pro-HSA-leader-szekvenciát is tartalmazza 52
4. A *GAPDH*-promótert és a pre-pro-HSA-leadert tartalmazó expressziós vektorokkal transzformált rekombináns élesztők vizsgálata 57

Eredmények megvitatása

A szintetikus *HSA*-gén 62
A génexpresszió szintje és a fehérjeszekréció viszonya 63
Képes-e a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő autentikus rekombináns HSA-t termelni? 64
Azonosítalan fehérjetermékek 65
Plazmidstabilitás, méretnagyítás 65

Irodalomjegyzék 68

Rövidítések jegyzéke 77

Köszönetnyilvánítás 79

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Ha körülnézünk utcán, villamoson, autóbuszon, sokfelé látunk véradásra felhívó plakátokat: *"A vér életet menthet!"*. A gyógyászatban számos vérkészítményt is használnak, melyek előállításához ugyancsak nagy mennyiségű vérre van szükség. Ugyanakkor az AIDS terjedő veszedelme növeli a bizalmatlanságot mind a természetes vérrel, mind az abból származó készítményekkel szemben. Egyre nő tehát az érdeklődés a biotechnológiai úton előállított, garantáltan vírusmentes véralkotók, vérpótló anyagok iránt. Ezek közül talán a legfontosabb a humán szérumalbumin (HSA), a vérplazmában legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérje, melyet - a vér frakcionálásával - óriási mennyiségben állítanak elő az orvosi gyakorlat számára.

Az albumin egyik fontos feladata az áramló vér normális ozmolaritásának fenntartása. Figyelemreméltó szubsztrátmegkötő képességének széles spektruma, mely a kálcium- és rézionoktól kezdve, a zsírsavakon, aminosavakon és hormonokon keresztül számos terápiás eljárásban alkalmazott gyógyszerig terjed. Bár alapvető funkciója máig is vitatott, sok transzport- és szabályozó folyamatban tulajdonítanak neki szerepet (Carter és mtsi., 1989).

A gyógyászatban albumint alkalmaznak traumás állapotban a vér pótlására, hipovalémia, sokk és hipoalbuménia kezelésére, valamint a keringő testnedvek perfúziójakor alkalmazott oldatok adalékanyagaként (Latta és mtsi., 1987).

Annak ellenére, hogy a vérből tisztított HSA egységenkénti ára - más véralkotókkal összehasonlítva - alacsony, a vérkészítményekkel szembeni bizalmatlanság és a szükséges rendkívül nagy mennyiség indokolja a HSA géntechnológiai módszerekkel történő előállítását, mint alternatívát, pl. fehérjetermelésre alkalmas rekombináns mikroorganizmus segítségével.

Legelterjedtebben baktériumokkal és élesztőkkel termeltetnek heterológ fehérjéket. A vektormolekulák egész rendszerét dolgozták ki DNS sejtbe juttatására. Transzkripciós és transzlációs szignálok, regulátor génszakaszok állnak rendelkezésre szinte bármely gazdasejt számára az idegen génexpresszió megvalósításához. A kereskedelmi szempontból értékes fehérjék termelésére alkalmas vektor-gazda-rendszerek kiválasztásában ma már nem maga a rendszer a limitáló tényező, hanem a gazdasági és ésszerűségi szempontok, valamint a termeltetni kívánt fehérje transzláció utáni módosításának követelményei (Kingsman, 1987).

Idegen gének expressziója és szekréciója baktériumokkal

A legjobban tanulmányozott és ezért legelterjedtebben alkalmazott fehérjetermelő gazdarendszer az *Escherichia coli* baktérium és a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő. Az *E. coli* baktérium széleskörű alkalmazását indokolja használatának egyszerűsége, gyorsasága és olcsósága, valamint a lehetséges genetikai manipulációk sora (Bilay, 1987).

A baktériumokkal végzett expressziós kísérletek során azonban számos probléma merülhet fel. Gyakori, hogy az *E. coli* citoplazmájában termelődött idegen fehérjék amino-terminális végükön felesleges metionin- vagy N-formil-metionin-csoportot hordoznak, melyek eltávolítása a fehérjék *in vitro* kezelését teszi szükségessé (Latta és mtsi., 1987; Zsebő és mtsi., 1986). A fehérjék érésük során gyakran igényelnek egy sor további poszttranszlációs átalakítást (lásd 1. táblázatot), amelyeket az *E. coli* nem képes elvégezni, sőt a citoplazmában uralkodó redukáló hatású belső környezet a molekulán belüli diszulfid-hidak kialakulását is gátolja (Bilay, 1987; Van Brunt, 1986). A poszttranszlációs módosítások hiánya, illetve tökéletlensége szinte törvényszerűen azt eredményezi, hogy a termelődött idegen fehérje konformációja, térbeli struktúrája (folding) - különösen, ha nagyméretű - eltér a normálistól, és gyakran oldhatatlan aggregátumok (inclusion body; Mitraki és King, 1989) formájában halmozódik fel a sejtben.

A kis molekulasúlyú fehérjékkel kapott sikeres - a periplazmatikus térbe történő - szekrécióval (Becker és Hsiung, 1986) ellentétben egyenlőre úgy látszik, hogy az *E. coli* szekréciós mechanizmusa alkalmatlan nagy molekulatömegű idegen fehérjék elfogadható expressziójára és szekréciójára (Latta és mtsi. 1987).

HSA *E. coli*-ban történő termelésére tett kísérletek is alátámasztják a felsorolt aggályokat (Latta és mtsi. 1987). Jóllehet az albumin egyetlen szálból álló, nem glikozilált fehérje (tehát poszttranszlációs glikozilálást nem igényel), nagy molekulsúlya (66,5 kD, 585 aminosav; Carter és mtsi., 1989; Lawn és mtsi., 1981) miatt szekréciója megoldhatatlannak bizonyult, a sejtekből tisztított fehérje pedig hordozta a felesleges N-terminális metionint, és oldhatatlan aggregátumokat képezett (Latta és mtsi., 1987).

Bacillus subtilis-szel végzett HSA-szekréciós kísérletek alapján (Saunders és mtsi., 1987) ugyan kimondhatjuk, hogy prokarióta sejtek is képesek lehetnek nagyméretű fehérjék szekréciójára, de az is kitűnt, hogy a megfelelő fehérjehasítás (a leader-fehérje lehasításának) hatékonysága fordított arányban áll a fehérje expressziójával.

Idegen gének expressziója és szekréciója élesztővel

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő ígéretes rendszernek bizonyult a felsorolt problémák egy részének kiküszöbölésére. Amellett, hogy nem patogén és endotoxinoktól is mentes élőlény, az évszázadokra visszamenő élesztőfermentációs tapasztalatok és a birtokunkban lévő egyszerűen kivitelezhető genetikai manipulációk sora is alátámasztják a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő alkalmazhatóságát idegen fehérjék kifejeztetésére és termelésére.

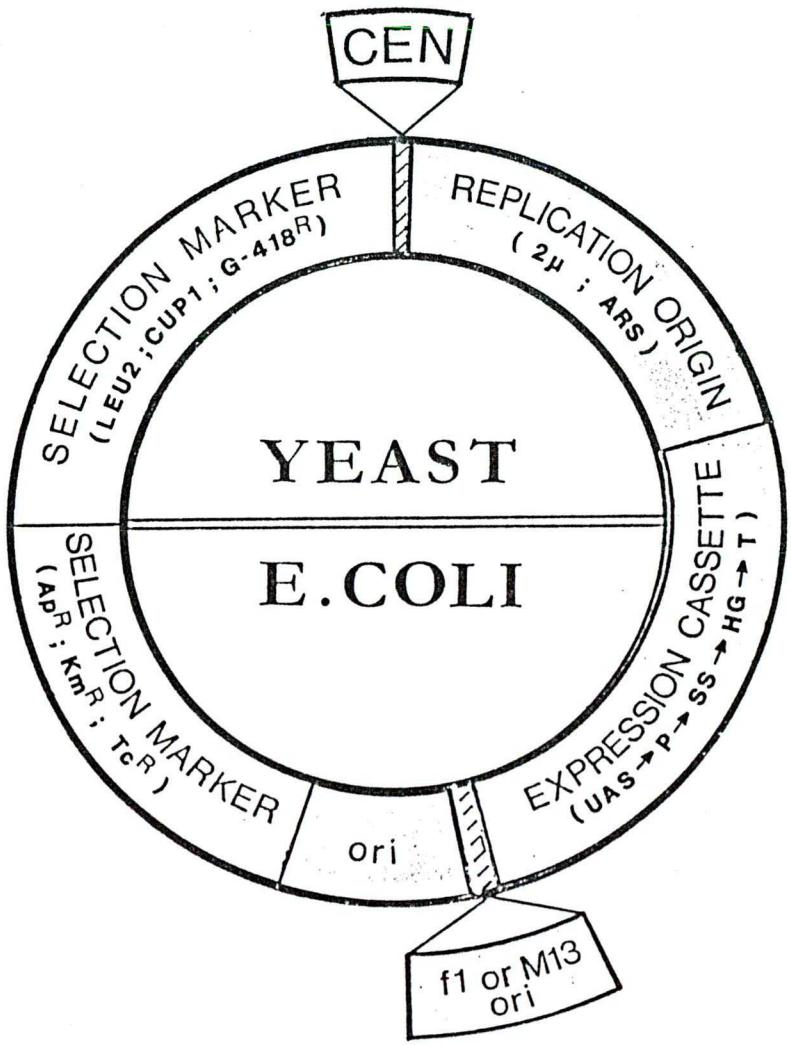
Élesztő expressziós vektorok

Idegen gének élesztősejtbe juttatása expressziós vektorok segítségével történik, melyeknek három típusa ismeretes (Botstein és Fink, 1988; 1. ábra):

1. Az ***élesztő centromerikus plazmidok (YCp = yeast centromere plasmid)*** kis kópiaszámúak (1-2 kópia/sejt), önálló replikációra képesek, mitotikusan és meiotikusan stabilak szelekció nélkül is, és szabályosan szegregálnak. Tartalmaznak élesztőben működő centromer-régiót, telomer-párt és replikátor génszakaszt (ARS = autonomously replicating sequence), ezért szokás *mesterséges élesztőkromoszómák*nak is nevezni őket (Wickner és Lodish, 1985). Használatuk akkor előnyös, ha az expressziós vektort kis kópiaszámban kívánjuk fenntartani, mert a géntermék az élesztősejtekre toxikus hatású és/vagy más típusú vektor stabilitása nagyon kicsi lenne (Bitter és mtsi., 1987).

2. Az ***élesztő integrálódóvektorok (Yip = yeast integrating plasmid)*** tartalmaznak élesztő szelekciós markereket, de hiányoznak belőlük azok a szekvenciák, melyek a plazmidok önálló replikációját lehetővé tennék élesztőben. Az élesztőgenom megfelelő szakaszaival homológ, rekombinációra alkalmas DNS-szekvenciájuk révén viszont beépíthetők a transzformált gazdasejt valamely kromoszómájába. Az idegen gén tehát stabil formában van jelen a sejtben (Botstein és Fink, 1988; Lopes és mtsi., 1989).

3. Az ***önálló replikációra képes élesztőplazmidok (YRp, YEp)*** nagy kópiaszámúak, instabilak és szegregációjuk nem szabályos. Önálló replikációra való képességüket annak köszönhetik, hogy replikációs origót (ori) tartalmaznak, mely lehet kromoszómális eredetű ARS ***(YRp = yeast replicating plasmid)***, illetve az élesztő saját 2μm-es plazmidjából (Futcher, 1988; Hartley és Donelson, 1980) származó ori ***(YEp = yeast episomal plasmid)***. Jóllehet mindkét expressziós vektor tartalmaz szelekciót biztosító markereket, az ARS-t hordozó plazmidok



1. ábra
Heterológ fehérjék expressziójára alkalmas ingázóvektor

UAS: "upstream" aktivátorelem
P: promóter
SS: szignálszekvencia
HG: heterológ fehérjét kódoló gén
T: transzkripciós terminátor
ARS: autonomously replicating sequence (kromoszómális eredetű replikációs origó)
CEN: centromer régió
2μ: az élesztő saját 2μ-os plazmidjából származó replikációs origó
Ap: ampicillin
Km: kanamicin
Tc: tetraciklin
R: (felső indexként) rezisztencia
ori: replikációs origó

szelekciós körülmények között sem stabilak (100 sejtciklus után a sejtpopuláció 40%-a nem tartalmaz plazmidot (Fincham, 1989; Van Brunt, 1986).
A felsorolt élesztővektorok egyben ingázóvektorok is, azaz *E. coli*-ban is képesek önálló replikációra.

Élesztő episzómális vektorok

a) Alap-építőkövek

A leggyakrabban alkalmazott élesztő expressziós vektorok episzómális plazmidok. Tartalmaznak pBR322-szekvenciákat (Bolivar és mtsi., 1977), melyek biztosítják *E. coli*-ban történő felszaporításukat és szelekciójukat, valamint az élesztőben való replikációt lehetővé tévő, a 2μm-es plazmidból származó ori-t és élesztő szelekciós markereket (Van Brunt, 1986; 1. ábra). A klónozott *TRP1*-, *LEU2*-, *HIS3*- és *URA3*-gének általánosan használt élesztőmarkerek. Számos auxotróf törzs létezik, melyek mutációt hordoznak a megfelelő génjükben. Triptofánt, leucint, hisztidint vagy uracilt nem tartalmazó tápközeg alkalmas a plazmiddal bíró sejtek szelektálására (Bitter és mtsi., 1987). Domináns szelekciós markereket is kifejlesztettek élesztők számára. Ilyen pl. a G418-rezisztencia (Jimenez és Davies, 1980; Webster és Dickson, 1983), melyet az *E. coli Tn5*- vagy *Tn903*-aminoglikozid-foszfotranszferáz-génje kódol, vagy a rézrezisztencia (Fogel és Welch, 1982), melyet az élesztö *CUP1*-génje kódol. A domináns szelekciós markerek használata nagyban megnöveli a gazdasejtválasztás lehetőségeit, hiszen auxotróf mutációkat nélkülöző gazdák alkalmazását is lehetővé teszik (Bitter és mtsi., 1987).

b) Élesztő expressziós kazetta

A felsorolt obligát elemeken kívül az idegen gének expressziójára alkalmas expressziós vektorok az ún. expressziós kazettát is hordozzák (lásd 1. ábrát), melynek három eleme: a ***promóter***, mely biztosítja az mRNS-transzkripció iniciációját; a megfelelő hosszúságú mRNS-lánc szintéziséért felelős ***terminátor***, mely biztosítja a transzkripció terminálását és a poli-A-farok kapcsolódását az mRNS 3'-végéhez; és az ***idegen fehérjét kódoló gén***, melynek pozíciója szigorúan meghatározott a promóter és terminátor között. Az idegen gén tartalmazza az ATG-transzlációs iniciációs kodont és egy vagy több transzlációs stop-kodont (Bitter és Egan, 1984; Bitter és mtsi., 1987).

Élesztőpromóterek

Mai tudásunk szerint csak az élesztő saját promótereit magukban foglaló expressziós vektorok alkalmasak idegen gének kifejezésére.
Az első sikeres kísérleti eredmény 1981-ből származik, amikor az alkohol-dehidrogenáz-gén (*ADH1*) promóterét felhasználva humán leukocita interferont termeltettek *S. cerevisiae*-vel (Hitzeman és mtsi., 1981). Ezt követte a humán τ-interferon expressziója a 3-foszfoglicerát-kináz-gén (*PGK*) promóterével (Derynck és mtsi., 1983), majd a represszálható savanyú foszfatáz-gén (*PHO5*) promóterének alkalmazásával a hepatitisz-B felszíni antigén (HBsAg; Miyanohara és mtsi., 1983) és a humán α-interferon (Kramer és mtsi., 1984) sikeres kifejezése.
A 2. táblázat foglalja össze az élesztő heterológ expressziós kísérletekben eddig alkalmazott promótereket, szignálszekvenciákat (lásd később) és az expresszált idegen fehérjéket.

a) *PHO5*-promóter

A *PHO5*-gén (Meyhack és mtsi., 1982) közepes erősségű promóterének egyik jellemző tulajdonsága az AT-bázispár nagy aránya (65%; a kódoló régióban ez csak 55%). A transzkripció iniciációjának meghatározásában alapvető szerepet játszó 5'-TATATAA-3'-szekvencia, az ún. TATA-box a transzláció iniciációs tripletjétől (ATG) 5'-irányban 101 bázispárra (bp) helyezkedik el.
Úgy tűnik, hogy a TATA-box elhelyezkedését tekintve alapvető különbség van a magasabbrendű eukarióta gének és az élesztőgének között: míg magasabbrendűekben a transzkripciós iniciációs kodon a TATA-boxtól 3'-irányban 25-30 nukleotid távolságban van, addig élesztőben ez a távolság változatosabb, 40-120 nukleotid hosszúságú. Négy különböző transzkripciós iniciációs helyet találtak a *PHO5*-gén 5'-nemkódoló régiójában a TATA-boxtól 44, 51, 57 és 72 nukleotid távolságban downstream, melyek közül az 51. és 57. az uralkodó iniciációs nukleotidok.
Az mRNS 5'-végének "védősapkával" ("cap") történő ellátásához szükséges 5'-TTCATCTCT-3'-szekvencia a TATA-boxtól 35 nukleotidnyira található 3'-irányban.
Tovább közelítve a TATA-boxtól az ATG-triplet felé az 59-68. pozícióban figyelmet érdemel az 5'-CAACAACAAA-3'-szekvencia, mely feltűnően hasonlít az 5'-CACACA-3'-hexanukleotidra. Ez utóbbi szekvencia ugyanis többé-kevésbé konzervatív az erős élesztőpromóterekben, az ATG-triplethez közel elhelyezkedve (Bajwa és mtsi., 1984; Dobson és mtsi., 1982).
Az élesztőpromóterek további fontos elemei a TATA-boxtól 5'-irányban helyet

foglaló ún. upstream aktivátorhelyek (UAS = upstream activation site), melyekből általában több is előfordul egy promóteren belül (lásd 2. ábrát). Ezek az upstream elemek szükségesek a transzkripcióhoz, és általában meghatározzák az adott promóter sajátos szabályozó funkcióját. Azok a gének, melyeknek kontrollmechanizmusa közös, hasonló DNS-szekvenciájú upstream elemekkel rendelkeznek. Az élesztő upstream elemek az emlős enhancer szekvenciákhoz hasonlítanak: mindkét orientációban működnek és távolságuk a többi promóterelemhez, ill. az mRNS iniciációs helyéhez képest változatos. Az enhancerektől eltérően azonban csak az iniciációs helytől 5'-irányban elhelyezkedve aktiválják a transzkripciót. Az általánosan elfogadott hipotézis szerint az upstream elemek transzkripciót szabályozó fehérjék kötőhelyei (Struhl, 1987).

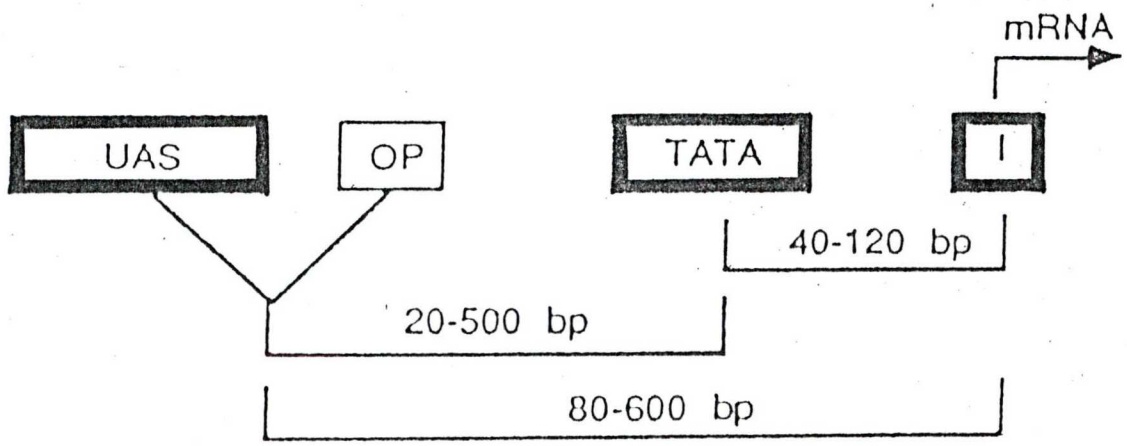
A *PHO5*-promóteren az upstream aktivátorelemek az ATG-transzlációs iniciációs kodontól 5'-irányban 367, 245 és 185 nukleotid távolságban találhatók (Rudolph és Hinnen, 1987). Ezek a 19 nukleotid hosszúságú, foszfátkontroll alatt álló repetitív szekvenciák közvetítő szerepet játszanak a *PHO5*-promóter aktivált és represszált állapotának kialakításában.

A *PHO5*-promóter a regulálható promóterek közé tartozik. A *PHO5*-gén (Arima és mtsi., 1983) által kódolt represszálható savanyú foszfatáz expressziója rendkívül alacsony nagy inorganikus foszfátkoncentrációjú tápközegben, míg 100-200-szorosra növekedhet az expresszió foszfátmentes tápközegben. Így a *PHO5*-promótert alkalmazva jól szabályozható rendszer hozható létre idegen gének expressziójára (Kramer és mtsi., 1984; Miyanohara és mtsi., 1983; 2. táblázat). Ez különösen előnyös, ha az idegen gén terméke mérgezi, esetleg megöli a gazdasejtet. A szabályozás révén a promóter represszált állapotában nagy sejtdenzitás érhető el, amit a környezet megfelelő átalakítása - a promóter "bekapcsolása" érdekében - követhet.

b) *GAPDH*-promóter

A *Saccharomyces cerevisiae* haploid genomonként három, nem egymás mellett elhelyezkedő gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz-gént (*GAPDH*) tartalmaz. A vegetatívan növekedő sejtekben mindhárom génről történik transzkripció.

A GAPDH-enzim a pékélesztő szárazanyag-súlyának 5%-át teszi ki, az enzimet kódoló mRNS aránya pedig 2-5%. A három, izoenzimet kódoló gén közül az bizonyult felelősnek a GAPDH-enzim legnagyobb mennyiségű termeléséért, melyet a pgap491-plazmid hordoz (Holland és Holland, 1979). Ez a tény is magyarázza, hogy ezen *GAPDH*-gén promóterét tartják az élesztő egyik legerősebb promóterének.



2. ábra
Az élesztőpromótereket felépítő elemek (Struhl, 1987)

UAS: "upstream" aktivátorelem
OP: operátor-elem
TATA: TATA-box
I: transzkripció iniciációja

SZTE

Dobson és mtsi. a leghatékonyabb élesztőpromóterek tanulmányozásakor felfedeztek néhány konzervatív szerkezeti sajátosságot, melyek feltehetően összefüggésben vannak hatékonyságukkal (Dobson és mtsi., 1982).

A *GAPDH*-gének 5'-nemkódoló régióinak vizsgálatakor kiderült, hogy ezek a szekvenciák itt is megtalálhatók.

Tekintsük át a pgap491-plazmidba klónozott *GAPDH*-gén promóterének szerkezeti sajátságait (Holland és Holland, 1980; Holland és mtsi., 1983):

+1-gyel jelölve az ATG-transzlációs iniciációs triplet A-ját, a -677. pozíciótól a -250. pozícióig terjedő génszakaszon az AT-bázispár aránya 60%, míg a -250-től a -24. pozícióig 71%.

A TATA-box a -141. pozícióban kezdődik: 5'-TATATAAA-3', és tőle 90 bp távolságban, 3'-irányban foglal helyet a transzkripciós iniciációs kodon, a -44. pozícióban. Ez a távolság jellemző az élesztőkre. (Meg kell jegyezni, hogy Musti és mtsi. a transzkripció iniciációjót a -37. és -38. pozícióba helyezték [Musti és mtsi., 1983]. A két adat közötti eltérés oka nem ismert.)

Az erős élesztőpromóterekre jellemző konzervatív szekvenciák a következők:

1. *CAAT-box*: ez a box - melyet az 5'-GG$\frac{C}{T}$CAATCT-3' konszenzus szekvenciával írtak le - az emlősgénekben gyakori, a transzkripció iniciációjától 70-80 bp-ra elhelyezkedve. Élesztőre ez a box kevésbé jellemző és a szekvenciahomológia általában kisebb. A *GAPDH*-5'-nemkódoló régióban megtalálható szekvencia - (-276)GGCAATTG(-269) - távolsága a transzkripció iniciációjától 224 bp.

2. *CT-gazdag régió + CAAG-szekvencia*: az erős élesztőpromóterekben a TATA-boxtól 3'- irányban 50-100 bp-nyira egy C+T-bázisokban gazdag régió található, melyet a CAAG-szekvencia követ 8-12 bp távolságban downstream. A *GAPDH*-5'-nemkódoló régió esetében a CAAG-szekvencia a -40. pozícióban kezdődik, egy T-bázisokban gazdag DNS-szakasz pedig a -48-tól a -61. pozícióig terjedő génszakaszon foglal helyet.

3. *CACACA-hexanukleotid*: ez az ATG-triplethez közel elhelyezkedő, az erős élesztőpromóterekben többé-kevésbé konzervatív szekvencia a *GAPDH*-promóterben a -13 - -18. pozícióban helyezkedik el.

Idegen fehérjék expressziójára először Bitter és Egan alkalmazták a legerősebb *GAPDH*-promótert (Bitter és Egan, 1984). Expressziós vektoruk kiépítéséhez az 5'-nemkódoló régió 650 bp hosszúságú *Taq*I-szakaszát használták fel, mely a promóter -24-től -1-ig terjedő szakaszát nem tartalmazta.

Szekréció

Idegen gének expressziójára baktériumokat alkalmazva gazdasejtként egy sor probléma merülhet fel, melyekről korábban már volt szó (lásd 1. táblázatot). Ugyanezen problémákkal találkozhatunk akkor is, ha élesztősejtekkel ugyan, de intracellulárisan próbálunk idegen fehérjéket termeltetni. A gondok leküzdésére az élesztő szekréciós rendszerén keresztül történő expresszió nyújt lehetőséget (Bitter, 1987). Egyrészt megfelelő expressziós-szekréciós kazetta felépítésével elérhetjük, hogy a szekretált idegen fehérje N-terminális vége azonos legyen az eredetivel, annak köszönhetően, hogy a szekréciós útvonalon az elsődlegesen keletkező prekurzor fehérjéről lehasad az ún. szignálfehérje (lásd később). Másrészt az eukarióta szekretórikus sejtekben (így az élesztőben is) az endoplazmatikus retikulum (ER) lumen felőli oldalán lokalizálódó fehérje-diszulfid-izomeráz-enzim közreműködésével kialakulnak a helyes intramolekuláris diszulfid-hidak. Harmadrészt a szekréciós útvonalat bejárva a fehérjék megkaphatják szénhidrát-oldalláncaikat, vagyis, ha szükséges, megtörténik glikozilálásuk (Bitter, 1987).

Mint az eukarióta sejtek mindegyike, a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő is sok glikozilált fehérjét szintetizál. Ezeket általánosan mannoproteineknek nevezik, mivel a cukoroldalláncok felépítésében részt vevő szénhidrát-molekula szinte kizárólagosan a mannóz. Az élesztő rendelkezik mind az oxigénhez, mind a nitrogénhez kapcsolódó glikozilálási szisztémával. Az ún. N-glikozilálás folyamata nagyon hasonló valamennyi eukarióta szervezetben, míg az O-glikozilálás a gombákra jellemző módon játszódik le.

N-glikozilálláskor a cukoroldallánc olyan aszparagin-molekula amino-csoportjához kapcsolódik, mely a következő aminosav-tripletben foglal helyet: Asn-X-Ser/Thr, ahol X bármilyen aminosav lehet, prolin és aszparaginsav kivételével. E szerkezeti sajátságon kívül természetesen számos egyéb faktor is befolyásolja a glikozilálást, így a polipeptid-szintézis sebessége, a potenciális glikozilálási helyek hozzáférhetősége, az oligoszacharidok mennyisége a sejtben és a glikoproteinek intracelluláris transzportjának sebessége. Az N-glikozilálás folyamatában a core-glikozilálás konzervált az eukariótákban, a külső oldalláncok szerkezete azonban eltérő lehet. Ez azt jelentheti, hogy azok az idegen fehérjék, melyek specifikus, komplex szénhidrát-oldalláncokat igényelnek, élesztőben termelődve nem lesznek tökéletesen aktívak. Ezért *in vitro* átalakításuk szükséges lehet (Kingsman és mtsi., 1987).

Az O-glikozilálás aminosavszekvencia-specificitását mindeddig nem sikerült feltárni. Annyi biztos, hogy a cukoroldalláncok szerin vagy treonin hidroxil-csoportján keresztül kapcsolódnak a fehérjékhez, és előnyösnek tűnik, ha az említett aminosavak N-terminális szomszédja prolin (Tanner és Lehle, 1987).

A poszttranszlációs módosítások eredményeképpen az élesztő által szekretált idegen fehérjék térbeli konformációja - nagy valószínűséggel - korrekt lesz.
Ezen túlmenően különösen előnyös az idegen fehérje szekréciója, ha az károsítja, esetleg megöli a gazdasejtet, vagy ha intracelluláris termelődése esetén instabil.
További nagy előny, hogy mivel az élesztő saját fehérjéi közül csak igen keveset szekretál (az összes fehérje 0,5%-át), a tápközegbe vagy a periplazmatikus térbe (a külső sejtmembrán és a sejtfal közötti térbe) szekretált idegen fehérje aránylag tiszta (Bitter és mtsi., 1987).

Szignálpeptid

A prokarióta és eukarióta sejtekből szekretált fehérjékre általánosan érvényes, hogy prekurzor fehérjemolekulák formájában keletkeznek, melyek N-terminális végén található az a szignálpeptid, mely a fehérjéket a szekréciós útra tereli (Boyd, 1985).
Egy sor prokarióta és eukarióta szignálpeptidet analizáltak már aminosavszekvenciájuk és funkciójuk szempontjából. Ezek a peptidek 15-30 aminosavból állnak és középső szakaszukon egy erősen hidrofób magot tartalmaznak.
A szekretált fehérjék transzlokációjára kidolgozott ún. hurokmodell szerint a szignálpeptidek három szakaszból állnak (Arima és mtsi., 1983). Az első szakasz a fehérje N-terminálisa, mely bázikus természtű aminosav(ak)ból áll, a második szakasz a hidrofób aminosavakból felépülő középső rész és a harmadik szakasz foglalja magában a hasítóhelyet, mely után az érett fehérje kezdődik. Az itt található aminosav jellemzője, hogy az α-szénatomon helyet foglaló oldallánca vagy egyáltalán nem tartalmaz szénatomot, vagy csupán egyet. Az egyes szakaszok lehetséges szerepe a következő: az első szakasz révén történik meg a fehérje elsődleges hozzákapcsolódása a citoplazmamembrán belső felszínéhez; ezt követi a citoplazmamembránba történő inszerciója a második szakasz révén; majd lehasadása a harmadik szakasznál.
A modellt ugyan *E. coli*-ra dolgozták ki, de a szerzők szerint prokariótákra és eukariótákra egyaránt érvényes (Inouye és Halegoua, 1979).
Saccharomyces cerevisiae-ben az elsőként tanulmányozott szignálfehérje a *PHO5*-gén által kódolt és a periplazmatikus térbe szekretálódó represszálható savanyú foszfatáz (SF) N-terminális szekvenciája volt (Arima és mtsi., 1983).
A SF szignálpeptidje 17 aminosavból áll, és megtalálhatók benne a hurokmodellben említett szakaszok. Így az N-terminális 3. aminosava a bázikus természetű lizin, amit a 8 aminosavból álló hidrofób mag követ. A szignálpeptid utolsó aminosava - ahol a szignálpeptidáz hasít - alanin, melynek α-szénatomján helyet foglaló oldallánca egy szénatomot tartalmaz. Mindez tovább erősíti azt a

feltételezést, hogy a szignálpeptidek szerkezete a törzsfejlődés különböző állomásait jelentő élőlényekben nagyon hasonló.
Valószínűleg ennek a szerkezeti hasonlóságnak köszönhetően, az expressziós-szekréciós vektorok kiépítésében az élesztő saját szekréciós szignáljai helyett felhasználhatók a termelni kívánt idegen fehérjék szekréciós szignáljai is (Boyd, 1985; 2. táblázat), természetesen csak abban az esetben, ha az idegen fehérje maga is szekretált fehérje, tehát rendelkezik a szükséges szignálpeptiddel. Ilyen fehérjék a peptidhormonok, a neuropeptidek és a vérplazma néhány fehérjéje, így a humán szérumalbumin is (Thomas és mtsi., 1988). Éppen a humán proalbumin volt, amelyről először bebizonyosodott, hogy az élesztő KEX2-endopeptidáza (mely az élesztő szekretált párosodási feromonjának, az α-faktornak szignálfehérjéjét lehasító enzimek közé tartozik; Boyd, 1985) képes lehasítani a proalbumin 6 aminosavból álló pro-szegmensét. Ez a hasítás az emberi szervezetben a májsejtek Golgi-apparátusában, az albumin érése során lejátszódó utolsó lépés (Bathurst és mtsi., 1987).
A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben a fehérjeszekréció folyamata fő vonásaiban megegyezik az emlőssejtekben megfigyelt folyamattal. A riboszómákon szintetizálódó szekretórikus fehérje szignálpeptidjének vezetésével keresztüljut az ER membránján. Ahogy az ER lumen felőli oldalán a növekvő polipeptidlánc megjelenik, a szignálpeptidáz-enzim lehasítja a szignálpeptidet és megkezdődik az oligoszacharil-transzferáz-enzim közreműködésével a fehérje O-hez és N-hez kapcsolódó core-glikozilálása (Deshaies és mtsi., 1989). Az ER-ból a Golgi-apparátusba, onnan a szekréciós vezikulumokba szállítódik a fehérje, miközben további glikozilálási lépéseken, esetleg más módosításokon (lásd 1. táblázatot) esik át. Végül a vezikulumok membránjának a plazmamembránnal történő összeolvadásával az érett fehérje kiszabadul a sejtmembránon kívüli térbe (Novick és mtsi., 1980; Novick és mtsi., 1981; Zsebő és mtsi., 1986).

Célkitűzés

Laboratóriumi munkánk első szakaszában arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő alkalmas-e autentikus (tehát az eredetivel tökéletesen azonos és így az orvosi gyakorlatban is alkalmazható) humán szérumalbumin termelésére.
Tervezett expressziós rendszerünk az irodalomban korábban leírtaktól (Etcheverry és mtsi., 1986; Latta és mtsi., 1987; Lawn és mtsi., 1981; Saunders és mtsi., 1987) több tekintetben is eltért. Egyrészt szintetikus, az élesztő kodonhasználatának figyelembevételével megtervezett struktúrgént tartalmazott (Kálmán és mtsi., 1990). Másrészt - az élesztő *PHO5*-promóterének és

-szekréciós szignáljának felhasználásával - igyekeztünk megvalósítani a HSA extracelluláris termelését.

Munkánk második szakaszában a génexpresszió és a szekréció tökéletesítése volt a célunk, azaz olyan vektor-gazda-rendszer létrehozása, mely megfelel az ipari termelés követelményeinek is, és így lehetővé teszi a HSA ipari méretű gyártását. Ennek érdekében egy újabb expressziós kazettát kívántunk felépíteni, melyben a *GAPDH*-promóter és a HSA saját szekréciós szignálja alapján tervezett szintetikus szignálszekvencia szerepel.

További fontos feladatunk volt annak bebizonyítása, hogy az élesztősejtek által szekretált rekombináns fehérje azonos a természetes HSA-val.

1. táblázat
***Escherichia coli* baktériumban és *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben lejátszódó poszttranszlációs átalakítási folyamatok (Bialy, 1987)**

Posztranszlációs átalakítás	*E. coli*	*S. cerevisiae*
Glikozilálás	nincs	van
Foszforilálás	nincs	van
Mirisztalizálás	valószínűleg nincs	van
Acetilálás	van	van
Zsírsavkapcsolás	?	van
Metioninel távolítás	van/nincs	van/nincs
Proteolízis	?	van/nincs
Specifikus aggregálás (partikulumképzés)	nincs	van
Folding	van/nincs	van/nincs
Szekréció	van/nincs	van

(? = az adat nem szerepel az irodalomban)

2. táblázat
***Saccharomyces cerevisiae* élesztővel termeltetett idegen fehérjék**

Termelt idegen fehérje	Promóter	Szekréciós szignál	Hivatkozás
Hepatitis-B vírus felszíni antigén (HBsAg)	*ADH1*	-	Valenzuela és mtsi., 1982
HBsAg-Herpes symplex felszíni antigén-hibrid	*GAPDH*	-	Valenzuela és mtsi., 1985b
HBsAg	*PGK*	-	Hitzeman és mtsi., 1983a
HBsAg	*GAPDH*	-	Bitter és Egan, 1984
HBsAg-pre-S(2)-epitop-hibrid	*GAPDH*	-	Langley és mtsi., 1988
HBsAg-HBV pre-S-génszakasz-hibrid	*GAPDH*	-	Valenzuela és mtsi., 1985a
HBsAg	*PHO5*	-	Miyanohara és mtsi., 1983
Hepatitis-B vírus core antigén	*GAPDH491*	-	Montgomery és mtsi., 1986
Influenza vírus hemagglutinin	*ADH1*	homológ	Jabbar és mtsi., 1985
Influenza vírus hemagglutinin	*ADH1*, *CUP1*	homológ	Jemtlanhd és mtsi., 1988
HTLV-III-gag-protein	*PHO5*	-	Kramer és mtsi., 1986
HTLV-III-proteáz	?	?	Kingsman és mtsi., 1987
HIV core antigén prekurzor(=p55gag)-protein	?	?	Jacobs és mtsi., 1988
HIV envelop polipeptidek	*ADH2/GAPDH*, *GAPDH*	-	Sabin és mtsi., 1988
HSV-1 D-glikoprotein	?	?	Kingsman és mtsi., 1987
Polioma virus middle T-fehérje	?	?	Kingsman és mtsi., 1987
Polio-virus 1.típus VP2-kapszid-polipeptid	*CYC1*, *GAL7*, *GAPDH*, *PHO5*, *PGK*	-	Verbakel és mtsi., 1986
Borjú leukémia vírus gp51-glikoprotein	*PHO5*	*PHO5*	Legrain és mtsi., 1986
Borjú leukémia vírus p24-protein	*PHO5*	-	Dumont és mtsi., 1988
Rotavírus VP7-glikoprotein	?	homológ	Hsiao és mtsi., 1986
Birnavírus antigének:			Vaughan
VP2:	?	*MFα1*	és mtsi., 1988
VP3:	*ADH1*, *CUP1*	-	

Semliki forest vírus poliprotein	*ADH1*	homológ	Keränen, 1986
Sindbis vírus E1-, E2-proteinek	*GAL1*	homológ	Wen és mtsi., 1986
Vezikuláris sztomatitis vírus glikoprotein	*GAL1*	homológ	Wen és mtsi., 1986
E. coli ß-laktamáz	?	homológ	Boyd, 1985
E. coli ß-laktamáz	?	*MFα1*, *SUC2*, *Kluyveromyces lactis* k1-plazmid ORF2-régió	Mileham és mtsi., 1986
E. coli lipo-ß-laktamáz	*GAL10*	homológ	Pines és mtsi., 1986
E. coli ß-galaktozidáz	*ADH1*, *CUP1*, rRNS-promóter (composed class I)	-	Andreassen és mtsi., 1988
E. coli ß-galaktozidáz	*CYC1*	-	Wingfield és Dickinson, 1988
Bacillus subtilis ß-glukanáz	?	homológ	Hinchcliffe és Box, 1984
Bacillus subtilis ß-glukanáz	*ADH1*	?	Cantwell és mtsi., 1986
Bacillus subtilis ß-glukanáz	?	*MFα1*	Lancashire és Wilde, 1986
Bacillus amyloliquefaciens α-amiláz	*ADH1*	homológ	Ruohonen és mtsi., 1987
Cellulomonas fimi celluláz	*ADH1*	Kluyveromyces lactis killer toxin leader-peptid-szekvencia	Skipper és mtsi., 1985
Thaumatococcus danielli thaumatin	*GAPDH*	-	Lopes és mtsi., 1988
Clostridium thermocellum endoglukanáz-A	*MFα1*	*MFα1*	Benitez és mtsi., 1989
Bakteriális ß-glukanáz	?	?	Kirkham és mtsi., 1988
Bakteriális ß-laktamáz	?	?	Kirkham és mtsi., 1988
Schwanniomyces occidentalis α-amiláz	homológ	homológ	Abarca és mtsi., 1988
Schwanniomyces occidentalis glukoamiláz	*PDC1*, *ADH1*, *GAL1*	homológ	Dohmen és mtsi., 1988
Schwanniomyces occidentalis α-amiláz + glukoamiláz	*GAL10/GAL1*	homológ	Dohmen és mtsi., 1988
Candida albicans ß-tubulin	?	?	Gorman és mtsi., 1988

Rhizopus glukoamiláz	?	?	Tanaka és mtsi., 1988
Aspergillus awamori glukoamiláz	*ENO1*	homológ	Innis és mtsi., 1985
Trichoderma reesei cellobiohidroláz-I, -II endoglukanáz-I, -III	*ADH1*	-	Aho és mtsi., 1988
Fonalas gomba α-amiláz	*ADH*	homológ	Vainio és mtsi., 1988
Plasmodium vivax antigén	*ADH2/GAPDH*	-	Barr és mtsi., 1987
Búza α-amiláz	*PGK*	homológ	Rothstein és mtsi., 1984
Francia bab fazeolin	homológ	homolóh	Cramer és mtsi., 1985
Pióca hirudin	?	?	Kingsman és mtsi., 1987
Csirketojás lizozim	p415	homológ	Oberto és Davison, 1985
Egér lambda-, μ-immunoglobulin	*PGK*	homológ	Wood és mtsi., 1985
Egér interleukin-2	*MFα1*	*MFα1*	Miyajima és mtsi., 1985
Egér FOS-fehérje	*PHO5*	-	Sambucetti és mtsi., 1986
Egér-pankreász α-amiláz	?	homológ	Boyd, 1985
Egér-pankreász α-amiláz	?	*MFα1*	Kingsman és mtsi., 1987
Egér granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor	*MFα1*	*MFα1*	Miyajima és mtsi., 1986
Egér epidermális növekedési faktor	?	*MFα1*	Van Brunt, 1986
Patkány citokróm-c	*ADH1*	-	Scarpulla és Nye, 1986
Patkánymáj citokróm-P-450 MC-protein	*ADH1*	-	Oeda és mtsi., 1985
Patkánymáj citokróm-P450e	*PHO5*	-	Zurbriggen és mtsi., 1988
Patkánymáj citokróm-P450e	*GAL10*	-	Lopes és mtsi., 1988
Patkány karboxipeptidáz-A	*MFα1*	*MFα1*	Gardell és mtsi., 1985
Sertés-pankreász profoszfolipáz-A_2	*GAPDH*	*MFα1*	Van Den Bergh és mtsi., 1987
Borjú kimozin	*PGK*	-, homológ	Mellor és mtsi., 1983

Borjú prokimozin	*SUC2*	*SUC2*	Smith és mtsi., 1985
Borjú-fibroblaszt növekedési faktor	*ADH2/GAPDH* hibrid	*MFα1*	Barr és mtsi., 1988
Humán leukocita D-interferon(IFN)	*ADH1*	-	Hitzeman és mtsi., 1981
Humán α-IFN	*PGK*	-	Tuite és mtsi., 1982
Humán αD-IFN	*PHO5*	-	Kramer és mtsi., 1984
Humán α1-, α2-, τ-IFN	*PGK*	homológ	Hitzeman és mtsi., 1983b
Humán α2-IFN	*PGK*	*SUC2*	Chang és mtsi., 1986
Humán α1-IFN	*MFα1*	*MFα1*	Singh és mtsi., 1984
Humán τ-IFN	*PGK*	-	Derynck és mtsi., 1983
Humán τ-IFN	*GAPDH*, *GAPDH/GAL1-10* hibrid	-	Bitter és Egan 1988
Humán τ-IFN	*ADH2/GAPDH* hibrid	-	Sabin és mtsi., 1989
Humán ß-IFN	?	?	Kingsman és mtsi., 1987
Humán ß-endorfin	*MFα1*	*MFα1*	Bitter és mtsi., 1984
Humán ß-endorfin	*MFα1*	*MFα1*	Zsebő és mtsi., 1986
Humán α1-antitripszin	*ARG3*	-, homológ	Cabezón és mtsi., 1984
Humán α1-antitripszin	*PHO5*	-	Rosenberg és mtsi., 1984
Humán α-, ß-hemoglobin	*GAPDH/GAL1-10* hibrid	-	Wagenbach és mtsi., 1991
Humán 2-interleukin	?	*MFα1*	Van Brunt, 1986
Humán 1ß-interleukin	*GAL/CYC1* hibrid	Kluyveromyces lactis killer toxin leader-peptid-szekvencia	Baldari és mtsi., 1987
Humán 1ß-interleukin	*CUP1*, *TDH3*	? (nem homológ)	Livi és mtsi., 1988
Humán szívpitvari nátriuretikus faktor	*MFα1*	*MFα1*	Vlasuk és mtsi., 1986
Humán Ha-*ras* által kódolt p21-fehérje	*PGK*	-	Clark és mtsi., 1985

Humán c-myc-fehérje	*PHO5*	-	Miyamoto és mtsi., 1985
Humán szérumalbumin (HSA)	*CUP1*	-	Etcheverry és mtsi., 1986
HSA	*PGK*	*MFα1*, homológ	Sleep és mtsi., 1988
HSA	*PHO5*	*PHO5*	Bajszár és mtsi., 1988
HSA	*GAPDH*	homológ	Kálmán és mtsi., 1990
Humán kalcitonin	*MFα1*	*MFα1*	Zsebő és mtsi., 1986
Humán eritroprotein	*GAPDH*, *GAPDH/GAL1-10* UAS hibrid	*MFα1*	Elliott és Griffin, 1986
Humán lizozim	*ADH1*	*MFα1*	Castañón és mtsi., 1988
Humán lizozim	?	csirke lizozim szignálszekvencia	Suzuki és mtsi., 1988
Humán lizozim	*GAL10*	csirke lizozim szignálszekvencia	Jigami és mtsi., 1986
Humán proinzulin	*ADH2/GAPDH* hibrid	-	Cousens és mtsi., 1987
Humán paratiroid hormon	?	Kluyveromyces lactis killer toxin leader-peptid-szekvencia, MFα1	Gabrielsen és mtsi., 1988
Humán granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor	*MFα1*	*MFα1*	Miyajima és mtsi., 1986
Humán kötőszöveti aktiválópeptid-III	*MFα1*	*MFα1*	Mullenbach és mtsi., 1986
Humán inzulin típusú növekedési faktor-I (IGF-I)	?	*MFα1*	Shuster és mtsi., 1988
Humán IGF-I	*GAPDH*	*MFα1*	Steube és mtsi., 1988
Humán epidermális növekedési faktor	*GAPDH*	-	Urdea és mtsi., 1983
Humán epidermális növekedési faktor	*MFα1*	*MFα1*	Brake és mtsi., 1984
Humán epidermális növekedési faktor	?	*MFα1*	Shuster és mtsi., 1988
Humán növekedési hormon-felszabadító faktor	?	*MFα1*	Van Brunt és mtsi., 1986
Humán α-transzformáló növekekedési faktor	?	*MFα1*	Van Brunt és mtsi., 1986
Humán fibroblaszt növekedési faktor	*ADH2/GAPDH* hibrid	*MFα1*	Barr és mtsi., 1988

Humán citokróm-c	*GAPDH*	-	Tanaka és mtsi., 1988
α-IFN Con1	*GAPDH* *MFα1*	- *MFα1*	Bitter és Egan, 1984
α-IFN Con1	*MFα1*	*MFα1*	Zsebő és mtsi., 1986
Acetilkolin-receptor	?	?	Kingsman és mtsi., 1987
Szomatomedin-C	*MFα1, ACT, CYC1*	MFα1	Ernst és mtsi., 1986
Szomatosztatin	?	?	Crumplen és mtsi., 1989
Kimotripszin	?	?	Crumplen és mtsi., 1989
α1-proteináz inhibítor	*ADH2/GAP*	-	Sabin és mtsi., 1989
Aszpartát proteáz	?	*MFα1*	Van Brunt és mtsi., 1986
Citokróm-P-450-proteinek	*PHO5, ADH1, GAPDH*	-	Käppeli és mtsi., 1988

(? = az adat nem szerepel az irodalomban)

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. *Escherichia coli* baktériumtörzsek

HB101 — F^-, *hsdS20*(r_B^-,m_B^-), *recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20*(Sm^R), *xyl-5, mtl-1, supE44,* lambda$^-$

JM101 — *supE, thi,* △(*lac-proAB*), [F', *traD36, proAB, lacI*^{q}Z△M15]

JM109 — *recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR*17, *supE*44, *relA1,* lambda$^-$, △(*lac-proAB*), [F', *traD36, proAB, lacI*^{q}Z△M15]

XL-1 Blue — *endA1, hsdR17*(r_k^-,m_k^+), *supE44, thi,* lambda$^-$, *recA1, gyrA96, relA1, lac*$^-$, [F', *proAB, lacI*^{q}Z△M15, *Tn-10*(tet^R)]

2. *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek

LL20 — *MATα; leu2; his3*

DBY746 — *MATα; his3-d1; leu2-3, 2-112; ura3-52; trp1-289a*

YNG452 — *MATα, ura3-52, leu2-d2, + , pep4-3, cir°*
MATα ura3-52 leu2-d2 his4-580 pep4-3

3. Tápoldatok és táptalajok baktériumok tenyésztéséhez (Maniatis, 1982)

LB (pH 7.5):	Bacto-tripton	1	%	10	g
	élesztőkivonat	0,5	%	5	g
	NaCl	1	%	10	g
	ad 1000 ml				
2YT:	Bacto-tripton	1,6	%	16	g
	élesztőkivonat	1	%	10	g
	NaCl	0,5	%	5	g
	ad 1000 ml				
M9:	Na_2HPO_4	0,6	%	6	g
	KH_2PO_4	0,3	%	3	g
	NaCl	0,05	%	0,5	g
	NH_4Cl	0,1	%	1	g
	a pH 7,4-re állítása és autoklávozás után hozzáadunk:				
	1 M $MgSO_4$	(2	mM)	2	ml
	20% glükóz	(0,2	%)	10	ml
	1 M $CaCl_2$	(0,1	mM)	0,1	ml
	1 mg/ml B_1 vitamin	(5	μg/ml)	5	ml
	ad 1000 ml				

Táptalajok: Tápoldatok + 1,5 % Bacto-agar

4. Antibiotikumok

Ampicillin: 100 μg/ml

Tetraciklin: 12,5 μg/ml; 96% Et-OH : H_2O = 1 : 1 arányú keverékében oldva

Az antibiotikumokat autoklávozás után 1000-szeres töménységű törzsoldatokból adjuk a tápoldatokhoz, ill. táptalajokhoz.
Az antibiotikum-törzsoldatokat szűréssel sterilizáljuk.

5. Tápoldatok és táptalajok élesztősejtek tenyésztéséhez

YPDP (komplett):	élesztőkivonat	1	%	10	g
	Bacto-pepton	2	%	20	ml
	KH_2PO_4	0,15	%	1,5	g
	autoklávozás után hozzáadunk:				
	40% glükóz	(2	%)	50	ml
	ad 1000 ml				

YNB (minimál):	Yeast nitrogene base				
		0,67	%	6,7	g
	40% glükóz	(2	%)	50	ml
	ad 1000 ml				

Nagy inorganikus foszfát(Pi)-koncentrációjú YNB:
YNB + 1,5 g/l KH_2PO_4

Kis Pi-koncentrációjú YNB:
YNB + 30 mg/l KH_2PO_4

YNBCA (aminosavakkal kiegészített YNB):
YNB + 1% Casamino acids
(a Casamino acids triptofánt nem tartalmaz)

Táptalajok: Tápoldatok + 2% Bacto-agar

6. Minimál tápoldatok és táptalajok kiegészítéséhez használt aminosavak

L-hisztidin-HCl: 20 mg/l

L-triptofán: 20 mg/l

Az aminosavakat autoklávozás után adjuk a tápoldatokhoz ill. táptalajokhoz
480 mg/100 ml-es törzsoldatokból.

7. Klónozáshoz használt enzimek

Restrikciós endonukleázok	New England Biolabs
T4 DNS-ligáz	New England Biolabs
T4 polinukleotid-kináz	Boehringer
Alkalikus foszfatáz	Boehringer

DNS-polimeráz I - Klenow fragment Boehringer

Az egyes enzimek alkalmazásakor Maniatis laboratóriumi kézikönyvében (1982) szereplő módszerek alapján jártunk el.

8. Plazmid-DNS-izolálás nagy mennyiségben (Birnboim, 1983; módosítva)

Anyagok és oldatok

GTE:	glükóz	50	mM	
	EDTA	10	mM	(pH 8)
	Trisz-HCl	25	mM	(pH 8)
	lizozim	10	mg/ml	(közvetlenül a felhasználás előtt mérjük az oldathoz)

Alkalikus SDS:	5N NaOH	(0,2 N)	400	µl
	20% SDS	(1 %)	500	µl

ad 10 ml
Az oldatot közvetlenül a felhasználás előtt készítjük el.

High salt:	K-acetát	3	M	29,4 g
	90% hangyasav	(1,8	M)	5 ml

ad 100 ml

Acetát-MOPS (pH 8):			
	Na-acatát	0,1	M
	MOPS	0,05	M

LiCl:	LiCl	5	M	

Ribonukleáz A:	RN-áz A	10	mg/ml	
	Trisz-HCl	10	mM	(pH 7,5)
	NaCl	15	mM	

TE:	Trisz-HCl	1	mM	(pH 8)
	EDTA	10	mM	(pH 8)

Kloroform: kloroform : izo-amilalkohol = 24 : 1 arányú keveréke

Fenol-kloroform: desztillált, telített fenol : kloroform : izo-amilalkohol = 25 : 24 : 1 arányú keveréke

Na-acetát (pH 6):	Na-acetát	3	M

Kloramfenikol:	kloramfenikol	34	mg/ml; 96% Et-OH-ban oldva

Munkamenet

8.1. 100 ml LB-tápoldatot (mely tartalmazza a szükséges antibiotikumot) beoltunk egy izolált baktériumteleppel.
Inkubálás: 37 °C, erőteljes rázatással, OD_{600} = 1 - 1,2 eléréséig.

8.2. Plazmidamplifikálás: a sejtszuszuszpenzióhoz adunk 50 µl kloramfenikolt.
Inkubálás: 37 °C, erőteljes rázatással, 18-20 óra.

8.3. A sejteket centrifugáljuk (4000 g, 10 perc, 4 °C).

8.4. A felülúszót leöntjük. A sejteket jégen tartva szuszpendáljuk 4,25 ml, lizozimot nem tartalmazó, jéghideg GTE-ben, majd a szuszpenzióhoz adunk 250 µl lizozimot tartalmazó jéghideg GTE-t.
Inkubálás: jégen, 15 perc.

SZEGED

8.5. A szuszpenzióhoz adunk 9 ml alkalikus SDS-t, óvatos keveréssel.
Inkubálás: jégen, 5 perc.
8.6. A szuszpenzióhoz óvatosan elegyítünk 6,75 ml high salt-ot.
Inkubálás: jégen, 15 perc.
8.7. Az elegyet centrifugáljuk (24000 g, 10 perc, 4 °C).
8.8. A felülúszóból a DNS-t kicsapjuk 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 20 perc.
8.9. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (14000 g, 10 perc, 4 °C).
8.10. A DNS-csapadékot feloldjuk 1 ml acatát-MOPS-ban.
8.11. Az oldatból kicsapjuk a DNS-t.
8.12. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (14000 g, 10 perc, 4 °C).
8.13. A DNS-csapadékot feloldjuk 1 ml H_20-ben, majd hozzáadunk 1 ml, jéghideg LiCl-ot.
Inkubálás: jégen, 15 perc.
8.14. Az elegyet centrifugáljuk (14000 g, 10 perc, 4 °C).
8.15. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t.
8.16. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (14000 g, 10 perc, 4 °C).
8.17. A DNS-csapadékot 300 μl TE-ben feloldjuk, és Eppendorf-csőbe tesszük át.
8.18. A DNS-oldathoz adunk 10 μl RN-áz A-t.
Inkubálás: 37 °C, 30 perc.
8.19. A DNS-oldatot extraháljuk: azonos térfogatú fenol-kloroformmal kétszer, majd azonos térfogatú kloroformmal egyszer.
8.20. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t 0,1 térfogat, 3 M Na-acatát és 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 1 óra.
8.21. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-centrifuga, 10 perc, 4 °C).
8.22. A csapadékot mossuk 1 ml, -20 °C-os, 70%-os Et-OH-lal 5 percig, majd megszárítjuk.
8.23. A csapadékot feloldjuk 300 μl H_2O-ben.

9. Plazmid-DNS-izolálás kis mennyiségben (miniplazmid-izolálás) (Birnboim, 1983; módosítva)

Anyagok és oldatok

Lásd 8. pontban

Munkamenet

9.1. 3-3 ml LB-tápoldatot (mely tartalmazza a szükséges antibiotikumot) beoltunk egy-egy izolált baktériumteleppel.
Inkubálás: 37 °C, erőteljes rázatással, egy éjszakán át.
9.2. A 3 ml-es sejtkultúrákat összecentrifugáljuk egy-egy Eppendorf-csőbe (Eppendorf-centrifuga, 20 másodperc).
9.3. A felülúszót leöntjük. A sejteket jégen tartva szuszpendáljuk 100 μl, 1 mg/ml lizozimot tartalmazó, jéghideg GTE-ben.
Inkubálás: jégen, 5 perc.
9.4. A szuszpenzióhoz adunk 200 μl alkalikus SDS-t és óvatosan összekeverjük.
Inkubálás: jégen, 5 perc.
9.5. A szuszpenziót óvatosan elegyítjük 150 μl high salt-tal.
Inkubálás: jégen, 15 perc.
9.6. Az elegyet centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).
9.7. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 20 perc.
9.8. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).

9.9. A DNS-csapadékot feloldjuk 100 µl H_2O-ben, majd hozzáadunk 100 µl, jéghideg LiCl-ot.
Inkubálás: jégen, 15 perc.
9.10. Az elegyet centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).
9.11. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t.
9.12. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).
9.13. A DNS-csapadékot feloldjuk 200 µl TE-ben.
9.14. A DNS-oldathoz adunk 4 µl RN-áz A-t.
Inkubálás: 37 °C, 30 perc.
9.15. A DNS-oldatot extraháljuk: azonos térfogatú fenol-kloroformmal, majd azonos térfogatú kloroformmal.
9.16. A felülúszóból a DNS-t kicsapjuk 0,1 térfogat, 3 M Na-acetát és 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 30 perc.
9.17. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).
9.18. A DNS-csapadékot mossuk 500 µl, -20 °C-os, 70%-os Et-OH-lal, 5 percig, majd megszárítjuk.
9.19. A DNS-t feloldjuk 20 µl H_2O-ben. Az oldat DNS-koncentrációja 100-200 ng/µl.

10. Kromoszóma- és plazmid-DNS-izolálás élesztőből (Holm, 1983; módosítva)

Anyagok és oldatok

SCE:	szorbitol	1	M	
	Na-citrát	100	mM	
	EDTA	60	mM	(pH 7)
Csigaenzim:	csigaenzim	300	mg/ml	
	ß-merkaptoetanol	10	%;	SCE-ben oldva
GuHCl (pH 8):	GuHCl	4,5	M	
	EDTA	100	mM	
	NaCl	150	mM	
	szarkozil	0,05	%	
10 x TE (pH 8):	Trisz-HCl	100	mM	
	EDTA	10	mM	
Proteináz K:	proteináz K	20	mg/ml	

Lásd még a 8. pontban

Munkamenet

10.1. 10 ml YNB-tápoldatot (mely tartalmazza a szükséges aminosavakat) beoltunk 1-1 izolált élesztőteleppel.
Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással, egy éjszakán át.
10.2. A sejttenyészetet centrifugáljuk (2000 g, 10 perc) és mossuk 10 ml H_2O-zel.
10.3. A sejteket szuszpendáljuk 150 µl SCE-ben és áttesszük Eppendorf-csövekbe.
10.4. A sejtszuszpenzióhoz adunk 10 µl csigaenzimet.
Inkubálás: 37 °C, 30 perc (a szferoplasztok képződéséig).
10.5. A sejteket centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 5-10 másodperc).
10.6. A sejtcsapadékról leszárítjuk a folyadékot és szuszpendáljuk 150 µl GuHCl-ban.
Inkubálás: 65 °C, 10 perc, időnkénti kevergetéssel.
10.7. A szobahőmérsékletű oldathoz 150 µl, -20 °C-os, 96%-os Et-OH-t elegyítünk, majd centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 5 perc).
10.8. A csapadékot szárítjuk, majd feloldjuk 300 µl 10 x TE-ben.

10.9. Az oldathoz adunk 3 μl RN-áz A-t.
Inkubálás: 37 °C, 1 óra.

10.10. Hozzáadunk 3 μl proteináz K-t.
Inkubálás: 65 °C, 30 perc.

10.11. Az oldatot extraháljuk: azonos térfogatú fenol-kloroformmal kétszer, majd azonos térfogatú kloroformmal egyszer.

10.12. A felülúszóból a DNS-t kicsapjuk 0,1 térfogat, 3 M Na-acetát és 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 30 perc.

10.13. A DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).

10.14. A DNS-csapadékot mossuk 500 μl, -20 °C-os, 70%-os Et-OH-lal 5 percig, majd szárítjuk.

10.15. A DNS-t feloldjuk 40 μl H_2O-ben.

11. DNS mólsúly szerinti elválasztása agarózgél-elektroforézissel (Maniatis, 1982)

Anyagok és oldatok

TBE-törzsoldat (5 x tömény):

Trisz	54	g
bórsav	27,5	g
50 mM EDTA (pH 8)	20	ml

ad 1000 ml

Gélelektroforézis-puffer: 0,5 x TBE

Agarózgél összetétele:
A vizsgálni kívánt DNS molekulahossz-tartományától függően
agaróz 0,8-1,2 %; 0,5 x TBE-ben

Mintafelvivő-puffer:

brómfenolkék	0,25	%	
xiléncianol	0,25	%	
EDTA	60	mM	(pH 8)
Ficoll 400	15	%	

Elektroforézis futási sebessége: 4 V/cm

Gélfestőoldat: etidium-bromid 0,5 μg/ml; 0,5 x TBE-ben oldva

12. Sanger-féle didezoxi-terminációs DNS-szekvenálás (Sanger és mtsi., 1977; Bankier és mtsi., 1987; módosítva)

Anyagok és oldatok

PEG-NaCl:	PEG 6000	20	%	
	NaCl	2,5	M	
TA:	Trisz-HCl	100	mM	(pH 8)
	Na-acetát	10	mM	(pH 6,5)
TM:	Trisz-HCl	100	mM	(pH 8,2)
	$MgCl_2$	50	mM	

Primerek: #1211 M13 Sequencing Primer (-20) 17MER (LMB2) (New England Biolabs)
#1201 M13 Reverse Sequencing primer (-24) 16MER (LMB3) (New England Biolabs)
Szintetikus HSA-primer (35 - 50) 16MER (Simoncsits A.)

Deoxyadenosine 5'-α-[^{35}S]thiotriphosphate, triethylammonium salt 8 μCi/μl, 650 Ci/mmol (Amersham)

dNTP-keverékek (N*):

	T* [μl]	C* [μl]	G* [μl]	A* [μl]
0,5 mM dTTP	10	200	200	200
0,5 mM dCTP	200	10	200	200
0,5 mM dGTP	200	200	10	200
TE-puffer	50	50	50	50
össz:	460	460	460	650

ddNTP-oldatok:

		10 mM ddNTP [μl]	H_2O [μl]
ddTTP	0,83 mM	20	240
ddCTP	0,1 mM	2,5	247,5
ddGTP	0,2 mM	5	245
ddATP	0,0675 mM	1,7	250

Terminátorelegyek: N* : ddNTP = 1 : 1 arányú keverékei

Terminátorelegy - Klenow-fragment-keverék:
terminátorelegy : Klenow-fragment (0,2-0,3 U/ l) = 1 : 1 arányú keveréke
A keveréket közvetlenül a felhasználás előtt mérjük össze, és folyamatosan jégen tartjuk.

Chase-oldat:

dTTP	0,25	mM
dCTP	0,25	mM
dGTP	0,25	mM
dATP	0,25	mM

Stop-oldat:

EDTA	1	mM
NaOH	10	mM
formamid (deionizált)	80	%
xiléncianol	0,1	%
brómfenolkék	0,1	%

1 M TBE-törzsoldat:

Trisz	1	M	121,1	g
bórsav	1	M	61,83	g
EDTA	10	mM	2,92	g

ad 1000 ml

Akrilamid (6%):

urea	48	%	480	g
akrilamid (2x kristályosított)	5,7	%	57	g
N,N'-metilén-biszakrilamid	0,3	%	3	g
1 M TBE	(90	mM)	90	ml

ad 1000 ml

APS:	APS	10	%
	Az oldatot felhasználás előtt, frissen készítjük el.		

A szekvenálógél összetétele:

akrilamid (6%)	99	ml
APS	800	μl
TMED	160	μl

Gélelektroforézis-puffer:

1 M TBE	(90	mM)	90 ml
ad 1000 ml			

Xilános CCl_4:	diklór-dimetil-xilán	5	ml
	CCl_4	95	ml

Lásd még a 8. pontban

12.1. M13 egyszálú fág-DNS tisztítása szekvenáláshoz (Bankier és mtsi., 1987; módosítva; Yanisch-Perron és mtsi. 1985)

Munkamenet

12.1.1. *E. coli* JM101 vagy X147 éjszakai tenyészetéből 100-szoros hígítást készítünk 2YT-tápoldatban. 2-2 ml sejtszuszpenziót fertőzünk 1-1 fág-plakkal.
Inkubálás: 37 °C, erőteljes rázatással, 5 óra.

12.1.2. 1,5-1,5 ml tenyészetet Eppendorf-csövekbe mérünk és centrifugálunk (Eppendorf-cf., 10 perc).

12.1.3. A felülúszóból óvatosan leszívunk 1,2 ml-t, áttesszük egy másik csőbe és ismét centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc).

12.1.4. A felülúszóhoz 200 μl PEG-NaCl-ot adunk.
Inkubálás: szobahőn, 15 perc.

12.1.5. A csapadékot centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 5 perc).

12.1.6. A felülúszót leöntjük, a csapadékról gondosan eltávolítjuk a PEG-NaCl nyomait is.

12.1.7. A csapadékot feloldjuk 100 μl TE-ben.

12.1.8. Az oldatot 50 μl fenollal extraháljuk.

12.1.9. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t 0,1 térfogat, 3 M Na-acetát és 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 20 perc.

12.1.10. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).

12.1.11. A DNS-csapadékot mossuk 500 μl, -20°C-os, 70%-os Et-OH-lal 5 percig.

12.1.12. A DNS-t feloldjuk 50 μl H_2O-ben.

12.1.13. A DNS-oldatot 50 μl kloroformmal extraháljuk.

12.1.14. = 12.1.9.

12.1.15. = 12.1.10.

12.1.16. = 12.1.11.

12.1.17. A DNS-csapadékot megszárítjuk.

12.1.18. A DNS-t feloldjuk 30 μl H_2O-ben. Egy szekvenáláshoz az oldat 5 μl-ét használjuk.

12.2. Kétszálú plazmid-DNS tisztítása szekvenáláshoz (Birnboim, 1983; módosítva)

Munkamenet

12.2.1-8. lépések azonosak a miniplazmid-izolálás (9. pont) megfelelő számú lépéseivel. A 3. lépésben a GTE nem tartalmaz lizozimot.

12.2.9. A DNS-csapadékot feloldjuk 400 μl TA-ban.

12.2.10. A DNS-t kicsapjuk 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.

Inkubálás: -20 °C, 20 perc.

12.2.11. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).

12.2.12. A DNS-csapadékot megszárítjuk és feloldjuk 100 μl TE-ben.

12.2.13. A DNS-oldathoz adunk 100 μl LiCl-ot.
Inkubálás: -20 °C, 30 perc.

12.2.14. Az elegyet centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).

12.2.15. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t.

12.2.16. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4 °C).

12.2.17. A DNS-csapadékot feloldjuk 100 μl H_2O-ben és ismét hozzáadunk 100 μl LiCl-ot.
Inkubálás: -20 °C, 15 perc.

12.2.18. Az elegyet centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 10 perc, 4°C).

12.2.19. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t.

12.2.20. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 15 perc, 4 °C).

12.2.21. A DNS-csapadékot feloldjuk 100 μl H_2O-ben.

12.2.22. A DNS-oldatot azonos térfogatú fenollal kétszer extraháljuk.

12.2.23. A felülúszóból kicsapjuk a DNS-t 0,1 térfogat, 3 M Na-acetát és 2,5 térfogat, -20 °C-os, 96%-os Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 30 perc.

12.2.24. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 15 perc, 4 °C).

12.2.25. A DNS-csapadékot feloldjuk 200 μl H_2O-ben, majd ismét kicsapjuk Na-acetát és Et-OH hozzáadásával.
Inkubálás: -20 °C, 30 perc.

12.2.26. A kicsapódott DNS-t centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 15 perc, 4 °C).

12.2.27. A DNS-csapadékot mossuk 500 μl, -20 °C-os, 70%-os Et-OH-lal 5 percig, majd megszárítjuk.

12.2.28. A DNS-t feloldjuk 30 μl H_2O-ben. Egy szekvenáláshoz az oldat 5 μl-ét használjuk.

12.3. Szekvenálási reakció

12.3.1. Plazmid-DNS szekvenálása

Munkamenet

12.3.1.1. A plazmid-DNS-t megemésztjük alkalmas restrikciós endonukleázzal, majd az enzimet hőkezeléssel inaktiváljuk (ha hővel nem inaktiválható, fenolozással távolítjuk el az enzimet).

12.3.1.2. Eppendorf-csőbe összemérjük a következőket:

emésztett, hőkezelt plazmid-DNS	5 μl (0,4 pM)
TM-puffer	2 μl
primer (1 pM/μl)	2 μl (2 pM)
H_2O	1 μl

12.3.1.3. Az elegyet 100 °C-os vízfürdőbe helyezzük és forraljuk 3 percig.

12.3.1.4. Forralás után azonnal jégbe tesszük.
Inkubálás: jégen, 5 perc.

12.3.1.5. Az elegyhez adunk 1,1 μl [^{35}S] dATP-t. Így kialakítjuk a templát-primer-elegyet.

12.3.1.6. A templát-primer-elegyből 4 x 2-2 μl-t mérünk mikrotiter-lemez lyukaiba, majd T, C, G, A sorrendben mindegyikhez hozzámérünk 4-4 μl terminátorelegy - Klenow-fragment-keveréket.
Inkubálás: szobahőn 15 perc, majd 37 °C-on 5 perc.

12.3.1.7. Mindegyik elegyhez adunk 2-2 μl chase-oldatot.
Inkubálás: 37 °C, 15 perc.

12.3.1.8 Mindegyik elegyhez adunk 4-4 μl stop-oldatot.

12.3.1.9. A lemezt óvatosan 100 °C-os vízfürdőbe helyezzük és forraljuk 3 percig.

12.3.1.10. Forralás után a mintákat felvisszük a szekvenálógélre.

12.3.2. Egyszálú fág-DNS szekvenálása

Munkamenet

12.3.2.1 Eppendorf-csőbe összemérjük a következőket:

egyszálú fág-DNS	5 μl (0,8 pM)
TM-puffer	1 μl
primer (0,1 pM/μl)	1,5 μl (0,15 pM)
H_2O	1,5 μl

Inkubálás: 60 °C, 30-50 perc.

12.3.2.2. Inkubálás után az elegyet jégre tesszük.

12.3.2.3. A további lépések azonosak a plazmid-DNS szekvenálásnál leírtakkal, az 5. lépéstől kezdődően.

12.4. Gélelektroforézis

Munkamenet

12.4.1. A megfelelően összeragasztott üveglapok közé öntjük a poliakrilamidgélt. Polimerizálási idő: min. 1 óra.

12.4.2. A gélt behelyezzük a szekvenálótankba és a tankot feltöltjük gélelektroforézis-pufferrel.

12.4.3. A minták felvitele előtt a fésű által kialakított zsebeket átöblítjük a gélelektroforézis-pufferrel és a mintákat T, C, G, A sorrendben felvisszük a gélre.

12.4.4. Gélelektroforézis: 20-25 W, 1200 V, 2-2,5 óra.

12.4.5. A gélelektroforézis befejezése után az üveg fedőlapot eltávolítjuk és az alsó üveglapon fekvő gélt 10%-os ecetsavban 15 percig fixáljuk.

12.4.6. A fixálás után a gélt Whatman 3MM-szűrőpapír felületére simítjuk és rászárítjuk vákumos gélszárító segítségével, 80 °C-on.

12.4.7. Autoradiográfia: a szűrőpapírra szárított gél felületére Röntgen-filmet helyezünk és Röntgen-film-kazettában exponálunk.
Exponálási idő: 3-24 óra.

12.4.8. Exponálás után a Röntgen-filmet előhívjuk és a szekvenciát leolvassuk.

12.5. DNS-szekvenálással ellenőrzött plazmidok

templát	primer
pUC18/623P	#1201 M13 Reverse
pUC18*/622P	#1201 M13 Reverse
pPT2/HSA2	Szintetikus HSA-primer
pGpreproHSA KR	Szintetikus HSA-primer
pGpreproHSA RR	Szintetikus HSA-primer

12.6. Az M13-fág-klónozórendszer (Yanisch-Perron és mtsi., 1985) felhasználásával - szekvenciaanalízissel - ellenőrzött DNS-szakaszok

templát	primer
pGpreproRR-plazmid *Xba*I-*Eco*RI-szakasza (M13mp18-vektor *Xba*I- és *Sca*I-hasítóhelye közé illesztve)	#1211 M13 Reverse
pGpreproRR-plazmid *Xba*I-*Sca*I-szakasza (M13mp18-vektor *Xba*I- és *Sma*I-hasítóhelye közé illesztve)	#1211 M13 Reverse
pGpreproKR-plazmid *Eco*RI-*Hind*III-szakasza (M13mp19-vektor *Eco*RI- és *Hind*III-hasítóhelye közé illesztve)	#1211 M13 Reverse

13. Baktériumtranszformálás (Hanahan, 1983; módosítva)

Anyagok és oldtok

SOB-tápoldat:

Bacto-tripton	20	g
élesztőkivonat	5	g
NaCl	585	mg
KCl	185	mg

autoklávozás után hozzáadunk:

1 M $MgCl_2$	10	ml
1 M $MgSO_4$	10	ml

(az oldatokat szűréssel sterilizáljuk)

ad 1000 ml

SOG-tápoldat: 100 ml SOB tápoldat + 800 µl 40% glükóz

TFB (pH 6,2):

1 M MES (pH 6,3)	(10	mM)	1	ml
RbCl	100	mM	1,21	g
$MnCl_2$ $4H_20$	45	mM	0,9	g
$CaCl_2$ $2H_2O$	10	mM	0,15	g
hexamin-kobalt-klorid	3	mM	80,3	mg

ad 100 ml
Az oldatot szűréssel sterilizáljuk.

DTT/K-acetát:

DTT	2,25	M
K-acetát	40	mM

X-Gal: X-Gal 2,5 %; dimetil-formamidban oldva

IPTG: IPTG 2,5 %; H_2O-ben oldva

Fedőagar: 2YT-tápoldat + 0,7% Bacto-agar
Felhasználáskor felolvasztjuk és 42 °C-on tartjuk.
Közvetlenül a felhasználás előtt 3-3 ml-éhez hozzámérünk:

X-Gal	40	µl
IPTG	40	µl

kezeletlen sejtszuszpenzió (OD_{600} = 1)
200 µl

13.1. Baktériumtranszformálás plazmid-DNS-sel

Munkamenet

13.1.1. Baktériumsejtek éjszakai tenyészetét 50-szeresére hígítjuk SOB-tápoldatban. 50 ml tenyészet 10 transzformációhoz elegendő.
Inkubálás: 37 °C, erőteljes rázatással, OD_{550} = 0,4 eléréséig.
13.1.2. A sejteket centrifugáljuk (1000 g, 10 perc, 4°C).
13.1.3. A sejteket szuszpendáljuk 16 ml jéghideg TFB-ben.
Inkubálás: jégen, 15 perc.
13.1.4. A sejteket centrifugáljuk (1000 g, 10 perc, 4 °C).
13.1.5. A sejteket szuszpendáljuk 2 ml jéghideg TFB-ben és hozzáadunk 70 µl DMSO-t.
Inkubálás: jégen, 5 perc.
13.1.6. A sejtszuszpenzióhoz adunk 70 µl DTT/K-acetátot.
Inkubálás: jégen, 10 perc.
13.1.7. A szuszpenzióhoz ismét hozzáadunk 70 µl DMSO-t.
Inkubálás: jégen, 5 perc.
13.1.8. A kompetens sejtek 200µl-eihez adjuk a transzformáló plazmid-DNS nem több, mint 40 ng-ját, max. 20 µl térfogatban.
Inkubálás: jégen, 30 perc.
13.1.9. Hősokk: a sejtszuszpenziót a jeges vízfürdőből 70 másodpercre 42 °C-os vízfürdőbe helyezzük.
13.1.10. A sejtszuszpenziót 3-4 percre visszatesszük a jeges vízfürdőbe.
13.1.11. A sejteket centrifugáljuk (Eppendorf-cf, 20 másodperc).
13.1.12. A sejteket óvatosan szuszpendáljuk 600 µl SOG-tápoldatban.
Inkubálás: 37 °C, 40 perc.
13.1.13. A sejtszuszpenziót a szükséges antibiotikumot tartalmazó LB-táptalaj felületére szélesztjük.
Inkubálás: 37 °C, egy éjszakán át.

13.2. Baktériumtranszformálás replikatív formájú (kétszálú) fág-DNS-sel

Munkamenet

13.2.1-10. lépések azonosak a 13.1. pont megfelelő számú lépéseivel.
13.2.11. A sejtszuszpenziót 3 ml fedőagarba mérjük, és 2YT-táptalaj felületére rétegezzük.
Inkubálás: 37 °C, egy éjszakán át.

14. Élesztőtranszformálás plazmid-DNS-sel (Hinnen, 1978; módosítva)

Anyagok és oldatok

Szorb-EDTA:	szorbitol	1,2	M	
	EDTA	25	mM	(pH 8)
	DTT	50	mM	(pH 8)
Szorb-EDTA-Citrát:	szorbitol	1,2	M	
	EDTA	10	mM	
	Na-citrát	100	mM	(pH 5,8)
STC:	szorbitol	1,2	M	
	Trisz-HCl	10	mM	(pH 7,5)
	$CaCl_2$	10	mM	
PEGTC:	PEG 4000	22	%	
	Trisz-HCl	10	mM	(pH 7,5)
	$CaCl_2$	10	mM	

YPDP-Szorb: YPDP-tápoldat + 1,2 M szorbitol

Regenerálóagar:

szorbitol	1,2	M
Bacto-agar	3	%

autoklávozás után hozzáadunk külön-külön:

YNB	0,67	%
glükóz	2	%
YPDP-tápoldat	2	% (v/v)

A regenerálóagart használat előtt felolvasztjuk és 45 °C-on tartjuk.

Munkamenet

14.1. 4 transzformáláshoz 40 ml YPDP-tápoldatot beoltunk egy izolált élesztőteleppel.
Inkubálás: 30 °C, rázatással, OD_{600} = 0,6 - 1 eléréséig.

14.2. A sejteket centrifugáljuk (3000 g, 5 perc).

14.3. A sejteket szuszpendáljuk 10 ml Szorb-EDTA-ban.
Inkubálás: 30 °C, lassú kevergetéssel, 20 perc.

14.4. A sejtszuszpenziót centrifugáljuk (3000 g, 5 perc).

14.5. A sejteket szuszpendáljuk 10 ml Szorb-EDTA-Citrát-ban. Hozzáadunk 200 mg frissen kimért csigaenzimet.
Inkubálás: 30 °C, lassú keveréssel, 30-60 perc (a szferoplasztok kialakulásáig).

14.6. A sejtszuszpenziót centrifugáljuk (3000 g, 5 perc).

14.7. A sejteket 3-szor mossuk 10-10 ml 1 M szorbitolban.

14.8. Az utolsó mosás után a sejteket szuszpendáljuk 400 µl STC-ben és 100 µl-enként szétosztjuk Eppendorf-csövekbe.

14.9. 100 µl-nyi kompetens sejthez max. 10 µl DNS-oldatot (1-3 µg DNS-t) adunk.
Inkubálás: szobahőn, 15 perc.

14.10. A sejtszuszpenzióhoz óvatosan hozzáadunk 1 ml PEGTC-t.
Inkubálás: szobahőn, 5 perc.

14.11. A sejtszuszpenziót centrifugáljuk (Eppendorf-cf., 20 másodperc).

14.12. A sejteket 300 µl YPDP-Szorb-ban szuszpendáljuk.
Inkubálás: 30 °C, 15 perc.

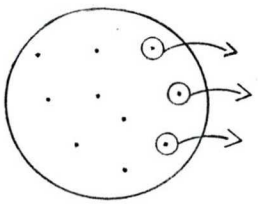
14.13. A sejtszuszpenziót 6-6 ml regenerálóagarhoz adjuk 100 µl-es adagokban, és YNB-táptalaj (mely tartalmazza a szükséges aminosav(ak)at) felületére rétegezzük.
Inkubálás: 30 °C, 3-5 nap.

15. Plazmidstabilitás vizsgálata rekombináns élesztősejtekben (uracilszelekció alkalmazásakor)

1. Élesztősejtek transzformálása plazmid-DNS-sel.

Rekombináns sejtkolóniák szelektálása YNBCA-táptalajon

2. 10 ml-es sejtkultúrák indítása YNBCA-tápoldatban 2-6 izolált telepből.



#1, #2...#6

3. Plazmidstabilitás vizsgálata az egyes izolátumokban.

#1 #2... #6

YNBCA-tápoldat —> YNBCA+/-uracil-lemezek

YNBCA-tápoldat —> YNBCA+/-uracil-lemezek

YNBCA-tápoldat —> YNBCA+/-uracil-lemezek

100%-nak tekintve az uracilt tartalmazó táptalajon felnövő sejtkolóniák számát, a plazmidstabilitást az uracilt nem tartalmazó (szelektív) táptalajon felnövő sejtkolóniák %-os arányával adjuk meg.

16. A *PHO5*-promóter indukciója a promótert tartalmazó expressziós vektorral transzformált rekombináns élesztősejtek tenyésztésekor

Anyagok és oldatok

Lásd 5. pontban

Munkamenet

16.1. A szelektív táptalajon felnőtt transzformáns sejtkolóniákat L-hisztidinnel kiegészített nagy Pi-koncentrációjú YNB-tápoldatban növesztjük. Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással, OD_{600} = 2 eléréséig (24-28 óra).

16.2. A sejteket centrifugáljuk (2000 g, 5 perc).

16.3. A sejteket szuszpendáljuk kis Pi-koncentrációjú L-hisztidinnel kiegészített YNB-tápoldatban (= a *PHO5*-promóter indukciója).
Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással.

17. Rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* sejttenyészetből nyert sejtfelülúszó tisztítása immuno(Western)-blot-analízishez

Anyagok és oldatok

Lásd 5. pontban és "Eredmények" 2.4.2. pontjában

Munkamenet

17.1. A szelektív táptalajon felnőtt transzformáns sejtkolóniákat 200 ml YNBCA-tápoldatban növesztjük.
Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással, OD_{600} = 3 eléréséig.
17.2. A sejttenyészetet centrifugáljuk (5000 g, 10 perc).
17.3. A sejtfelülúszó pH-ját 7-re állítjuk és Blue sepharose CL 6B-oszlopon (Pharmacia) tisztítjuk az "Eredmények" 2.4.2 pontjában leírtak szerint.
17.4. Az oszlopról eluált oldatot H_2O-zel szemben dializáljuk 2 x 12 órán át (oldószercsere), majd térfogatát ultraszűréssel 400 µl-re csökkentjük.

18. Élesztősejtek feltárása ELISA-teszthez

Anyagok és oldatok

Sejtfeltáróoldat:	H_2O	2,52	ml
	20% SDS	280	µl
	PMSF	70	µl
	trazylol	14	µl

Munkamenet

18.1. Rekombináns élesztősejteket 48 órán át szaporítunk 200 ml szelektív tápoldatban (30 °C, erőteljes rázatással).
18.2. A sejteket centrifugáljuk (2000 g, 10 perc) és mossuk 10 ml H_2O-zel.
18.3. A sejtcsapadékhoz 700 µl sejtfeltáróoldatot adunk és a szuszpenziót áttesszük Eppendorf-csőbe.
18.4. Hozzáadunk 2/3 térfogat 0,45 µm átmérőjű üveggyöngyöt és erőteljesen rázzuk (Vortex) 2 x 90 másodpercig.
18.5. Az üveggyöngyös sejtszuszpenziót forró vízfürdőben forraljuk 3 percig.
18.6. A szuszpenziót ismét rázzuk (Vortex) 2 x 90 másodpercig, majd ismét forraljuk 3 percig.
18.7. A szuszpenziót centriugáljuk (Eppendorf-cf., 20 másodperc).
18.8. A felülúszóból 100 µl-t használunk fel ELISA-teszthez; ha szükséges, megfelelő hígításokban.

19. rHSA (fehérjeantigén) tisztítása sejtfelülúszóból immunaffinitás-kromatográfiával (Mayes, 1984; módosítva)

Anyagok és oldatok

Immunoadszorbens:
kecskében termelt, anti-HSA-szérumból tisztított immunoglobulin,
- karbodiimid keresztkötő ágenssel - Fractogel TSK AF-Amino 650-gélhez kötve

PBS (pH 7,4):	lásd 20. pontban			
High salt:	Na-foszfát	10	mM	(pH 7,4)
	NaCl	1	M	
Na-citrát (pH 7,3):	Na-citrát	50	mM	

Munkamenet

19.1. YNBCA-tápoldatban OD_{600} = 2 eléréséig növesztett rekombináns sejtek felülúszójából 150 ml NaCl-koncentrációját 150 mM-ra, pH-ját 7,4-re állítjuk be (az értékek a PBS-nek felelnek meg).

19.2. A felülúszót (mely az rHSA-t = fehérjeantigént tartalmazza) inkubáljuk a korábban PBS-sel mosott immunoadszorbens 10 ml-évél.
Inkubálás: 4 °C, folyamatos kevertetéssel, 2 óra.

19.3. A gélről a sejtfelülúszót szűréssel eltávolítjuk, majd a gélt mossuk 100 ml high salt-tal, majd 50 ml PBS-sel.

19.4. Az immunoadszorbenset 1 x 10 cm-es oszlopba töltjük.

19.5. Az immunoadszorbenshez kötődő rHSA-t Na-citráttal eluáljuk az oszlopról.

19.6. Az rHSA-t tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és H_2O-zel szemben dializáljuk (4 °C, 24 óra).

19.7. Az oldat térfogatát ultraszűréssel 400 µl-re csökkentjük. Az oldat 10 µl-ét futtatjuk SDS-poliakrilamidgélen.

20. Fehérjék mólsúly szerinti elválasztása SDS-poliakrilamidgél-elektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; módosítva)

Anyagok és oldatok

30% akrilamid-törzsoldat:

akrilamid	29	%	29	g
N',N-metilén-biszakrilamid	1	%	1	g

ad 100 ml

APS:	APS	10	%	

Szeparálógél-puffer (4 x tömény; pH 8,8):

Trisz	1,5	M	181,64	g
SDS	0,4	%	4	g

ad 1000 ml

Stacking-gél-puffer (4 x tömény; pH 6,8):

Trisz	0,5	M	60,56	g
SDS	0,4	%	4	g

ad 1000 ml

Gélelektroforézis-puffer (10 x tömény; pH 8,3):

Trisz	0,5	M	60,56	g
SDS	1	%	10	g
glicin	3,84	M	288	g

ad 1000 ml

Mintafelvivő-puffer (2 x tömény; pH 8):

Trisz	20	mM	242	mg
EDTA	2	mM	5,8	g
SDS	2	%	200	mg
ß-merkaptoetanol	10	%	1	ml
glicerol	20	%	2	ml
brómfenolkék	0,04	%	4	mg

ad 10 ml

SDS-PAGE-mólsúlymarker:

SDS-PAGE-mólsúlymarker (Boehringer)	50	µl
mintafelvivő-puffer	500	µl

ad 1 ml
Egy SDS-poliakrilamidgélre 5 µl markert viszünk fel.
Mólsúlytartomány: 10000-100000 D

10%-os szeparálógél összetétele:

30% akrilamid-törzsoldat	6,6	ml
szeparálógél-puffer	5	ml

ad 20 ml
vákum alatt levegőtlenítjük 5 percig, majd hozzáadunk:

APS (10%)	100	µl
TMED	10	µl

5%-os stacking-gél összetétele:

30% akrilamid-törzsoldat	1	ml
stacking-gél-puffer	1,5	ml

ad 6 ml
vákum alatt levegőtlenítjük 5 percig, majd hozzáadunk:

APS (10%)	45	µl
TMED	4,5	µl

Gélfixálóoldat:

metanol	50	%	500	ml
jégecet	10	%	100	ml

ad 1000 ml

Gélfestőoldat:

Comassie Blue R250	0,1	%	1	g
metanol	25	%	250	ml
jégecet	10	%	100	ml

ad 1000 ml

Festékkimosó-oldat:

metanol	25	%	250	ml
jégecet	10	%	100	ml

ad 1000 ml

Munkamenet

20.1. Megöntjük a szeparálógélt és tetejére izo-butanolt rétegzünk.
Polimerizálódási idő: 30-60 perc.
Polimerizálódás után az izo-butanolt gondosan eltávolítjuk.

20.2. A szeparálógél tetejére rétegezzük a stacking-gélt, melybe a fésűt süllyesztjük.
Polimerizálódási idő: 30-60 perc.

20.3. A fehérjemintákat 1 : 1 arányban elegyítjük 2 x tömény mintafelvivő-pufferrel, és 5 percre forró vízfürdőbe helyezzük.
20.4. A fésű eltávolítása után a gélt behelyezzük a futtatótankba és a tankot feltöltjük gélelektroforézis-pufferrel
20.5. A gél zsebeit átöblítjük gélelektroforézis-pufferrel és a mintákat felvisszük.
20.6. Gélelektroforézis: 15-20 mA, szobahőn, 1-1,5 óra.
20.7. A gélelektroforézis befejezése után a szeparálógélt gélfixálóoldatba helyezzük.
Inkubálás: szobahőn, lassú mozgatással, 30 perc.
20.8. A gélt gélfestőoldatba helyezzük.
Inkubálás: szobahőn, lassú mozgatással, 2 óra.
20.9. A fölösleges festéket a gélből elektroforézissel távolítjuk el.
Puffer: festékkimosó-oldat.
Elektroforézis: 24 V, 45 perc.
20.10. A gélt szűrőpapír felületére szárítjuk.

21. Immuno(Western)-blot-analízis (Towbin és mtsi., 1979; módosíva)

21.1. A fehérjeminták futtatása SDS-poliakrilamidgélen

Lásd 20. pontban

21.2. Fehérjék átvitele poliakrilamidgélről nitrocellulóz-filterre (elektroblot)

Anyagok és oldatok

Blot-puffer (pH 8,3):

Trisz	25	mM	3,03	g
glicin	192	mM	14,42	g
metanol	20	%	200	ml
(0,1% SDS hozzáadása segítheti a transzfert)				
ad 1000 ml				

PBS (pH 7,2 ± 0,2)

$Na_2HPO_4\ 2H_2O$	7,5	mM	1,34	g
vagy $Na_2HPO_4\ 12H_2O$	7,5	mM	2,68	g
$NaH_2PO_4\ H_2O$	2,5	mM	345	mg
vagy $NaH_2PO_4\ 2H_2O$	2,5	mM	390	mg
NaCl	145	mM	8,47	g
ad 1000 ml				

Streptavidin - biotinilált peroxidáz-komplex:

streptavidin	0,6	µg/ml
biotinilált peroxidáz	1	mg/ml

A két oldatot 1 : 1 arányban elegyítjük, majd 1 órán át inkubáljuk 4 °C-on.
A komplex 4 °C-on tárolva 1 évig stabil.

Ellenanyag: kecskében termelt, poliklonális, biotinnal jelölt anti-HSA
0,65 mg/ml; PBS-ben oldva

Kloronaftol:

kloronaftol	1-1,5	mg/ml;	4 ml 96% Et-OH-ban oldva
50 mM Trisz-HCl (pH 7,5)	16	ml	
H_2O_2	20	µl	

Az oldatot közvetlenül a felhasználás előtt készítjük el.

Munkamenet

21.2.1. A fehérjeminták poliakrilamidgélen történő szeparálása után a szeparálógélt blot-pufferbe helyezzük.
Inkubálás: 15 perc.
A Western-blot-szendvics többi komponensét is min. 15 percre blot-pufferbe tesszük.

21.2.2. Összeállítjuk a Western-blot-szendvicset:

szivacs - pólus
2 réteg Whatman 3MM-szűrőpapír
akrilamidgél
nitrocellulóz-filter
2 réteg Whatman 3MM-szűrőpapír
szivacs + pólus

A szűrőpapír és a nitrocellulóz mérete megegyezik a gél méretével.

21.2.3. A "szendvicset" a blot-pufferbe merítjük (a nitrocellulóz-filter helyezkedik el a + póluson).
Elektroblot: 400 mA, 10 °C, 2 óra, vagy 100 mA, szobahőn, egy éjszakán át.

21.2.4. A nitrocellulózt PBS-sel mossuk, enyhe mozgatással, 3 x 10 percig.

21.2.5. A nitrocellulózt telítjük (blokkoljuk az aspecifikus ellenanyagkötő-helyeket): PBS + 5% BSA-, vagy + 0,5% zselatinoldatba helyezzük.
Inkubálás: szobahőn (zselatin esetében 37 °C), enyhe mozgatással, 1 óra.

21.2.6. A nitrocellulózt PBS-sel mossuk, enyhe mozgatással, 3 x 10 percig.

21.2.7. Kialakítjuk az antigén - antitest-kapcsolódást: a filtert PBS + ellenanyag (1:1000 hígításban) + 1% BSA + 0,05% Tween 20-oldatba helyezzük.
Inkubálás: szobahőn, enyhe mozgatással, 1 óra.

21.2.8. A nitrocellulózt PBS + 0,05% Tween 20-oldattal mossuk, enyhe mozgatással, 3 x 10 percig.

21.2.9. Kialakítjuk a biotinilált ellenanyag - streptavidin - biotinilált peroxidáz-kapcsolódást: a filtert PBS + streptavidin - biotinilált peroxidáz-komplex (1:1000 hígításban) + 1% BSA + 0,05% Tween 20-oldatba helyezzük.
Inkubálás: szobahőn, enyhe mozgatással, 1 óra.

21.2.10. A nitrocellulózt PBS + 0,05% Tween 20-oldattal mossuk, enyhe mozgatással, 3 x 10 percig.

21.2.11. Előhívás: a filtert sötétben, kloronaftol-oldatba helyezzük.
Inkubálás: sötétben, 10-15 perc (az immunoblot megjelenéséig).

21.2.12. Az előhívási reakciót H_2O-zel állítjuk le.
A nitrocellulóz-filtert H_2O-es öblítés, majd szárítás után sötétben tároljuk.

22. ELISA-teszt (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Jackson és mtsi., 1982).

Anyagok és oldatok

PBS-coating: azonos a Western-blot-analízisnél (21. pont) leírt PBS-sel

PBS-mosó: PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5 M NaCl

Zselatinoldat: zselatin 0,5 %; PBS-coating-pufferben oldva

Citromsav-foszfát-puffer (pH 5 ± 0,2):

citromsav	34,7	mM	7,3	g
Na_2HPO_4 $2H_2O$	66,7	mM	11,87	g
vagy Na_2HPO_4 $12H_2O$				
	66,7	mM	23,87	g

ad 1000 ml

OPD: citromsav-foszfát-puffer 10 ml
OPD 8 mg
H_2O_2 8 µl
Az oldatot közvetlenül a felhasználás előtt készítjük el.

Munkamenet

22.1. Mikrotiter-lemez lyukaiba lekötjük az ellenanyagot: a lyukakba 100-100 µl PBS-coating-pufferrel 1000 x hígított, biotinilálatlan anti-HSA-t (ellenanyagot) pipettázunk.
Inkubálás: 37 °C, 1-2 óra.
22.2. A lyukakból eltávolítjuk az ellenanyagot és a lemezt PBS-mosóval mossuk 3 x 3 percig.
22.3. A lemezt telítjük: a lyukakba 100-100 µl zselatinoldatot pipettázunk.
Inkubálás: 37 °C, 30-45 perc.
22.4. A zselatint eltávolítjuk és a lemezt PBS-mosóval mossuk 3 x 3 percig.
22.5. Kialakítjuk az antitest - antigén-kapcsolódást: a lyukakba 100-100 µl, 10 µg/ml koncentrációjú, PBS-mosóban oldott fehérjemintát (antigént) pipettázunk.
Inkubálás: 37 °C, 1 óra.
22.6. Az antigént eltávolítjuk és a lemezt PBS-mosóval mossuk 3 x 3 percig.
22.7. A lemezt fedjük biotinnal jelölt anti-HSA-val (ellenanyaggal): a lyukakba 100-100 µl, PBS-mosóval 1000-szeresre hígított biotinilált ellenanyagot pipettázunk.
Inkubálás: 37 °C, 1 óra.
22.8. Az ellenanyagot eltávolítjuk, és a lemezt PBS-mosóval mossuk 3 x 3 percig.
22.9. A lemezt fedjük streptavidin - biotinilált peroxidáz-komplex-szel: a lyukakba 100-100 µl, PBS-mosóval 1000 x hígított streptavidin - biotinilált peroxidáz-komplexet pipettázunk.
Inkubálás: 37 °C, 50-60 perc.
22.10. A komplexet eltávolítjuk és a lemezt PBS-mosóval mossuk 3 x 3 percig.
22.11. Előhívás: a lyukakba 100-100 µl OPD-oldatot pipettázunk.
Inkubálás: pár perc (a megfelelő színreakció lejátszódásáig).
22.12. Az előhívási reakcót 100-100 µl 4N H_2SO_4-val állítjuk le.

23. Northern-blot-analízis (Schleicher és Schuell, 1987)

Anyagok és oldatok

RNS-denaturáló oldat (pH 6,5):
glioxál 1 mM
$NaHPO_4$ 10 mM (pH 6,5)

Mintafelvivő-puffer (6 x tömény):
lásd 10. pontban

Gélelektroforézis-puffer (pH 6,5):
$NaHPO_4$ 10 mM

Blot-puffer = 20 x SSC (pH 7):
NaCl 3 M
Na-citrát 0,3 M

SSPE (1 x; pH 7,7): NaCl 0,18 M
$NaHPO_4$ 10 mM (pH 7,7)
EDTA 1 mM

Denhardt-oldat (1 x):

ficoll	0,02	%
PVP	0,02	%
BSA	0,02	%

Prehibridizáló-oldat:

formamid	50	%
Denhardt-oldat	5	x
SDS	0,5	%
szonikált lazac sperma-DNS	100	μg/ml
SSPE	5	x

Hibridizálóoldat: dextrán-szulfát 10 %
tRNS 100 μg/ml
radioaktív DNS-próba (a *HSA*-gén *Sal*I - *Xba*I 921 bp hosszúságú szakasza ^{32}P-vel jelölve; a jelölés "random primer" módszerrel történt α-[^{32}P]-dezoxi-ATP jelenlétében)
0,2 μg

Munkamenet

23.1. RNS tisztítása rekombináns élesztősejtekből

23.1.1. 50-50 ml L-hisztidinnel kiegészített, nagy Pi-koncentrációjú YNB-tápoldatot párhuzamosan beoltunk egyazon izolált rekombináns élesztőteleppel.
Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással, 24 óra.

23.1.2. Az egyik kultúrából a sejteket centrifugálással összegyűjtjük (4000 g, 5 perc) és szuszpendáljuk L-hisztidinnel kiegészített, kis Pi-koncentrációjú YNB-tápoldatban (ezzel a *PHO5*-promótert indukáljuk).
Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással, további 24 óra.
A másik sejtkultúrát változatlanul növesztjük további 24 órán át.

23.1.3. A sejtszuszpenziókat centrifugáljuk (4000 g, 5 perc).

23.1.4. A sejteket lizáljuk (lásd "Eredmények" 2.4.1.3 - 2.4.1.8.) és a sejtlizátumot azonos térfogatú fenollal extraháljuk.

23.1.5. Az RNS-t CsCl-grádiens-ultracentrifugálással tisztítjuk tovább (Cooper és Moss, 1979).

23.2. Az RNS frakcionálása

23.2.1. 50-60 μg RNS-mintát glioxálkezeléssel denaturálunk: az RNS-t a denaturáló-oldatban inkubáljuk (50 °C, 60 perc).

23.2.2. A denaturált RNS-hez 1/5 térfogat mintafelvivő-puffert adunk és méret szerint frakcionáljuk 1,25%-os, horizontális agarózgélen történő futtatással.
Gélelektroforézis: 30 V, egy éjszakán át, az gélelektroforézis-puffer állandó áramoltatásával.

23.3 Az RNS átvitele nitrocellulóz-filterre

23.3.1. Az agarózgéllel azonos méretű nitrocellulóz-filtert óvatosan desztillált víz felszínére helyezzük, majd átnedvesedése után alámerítjük.

23.3.2. Közvetlenül a blot előtt a filtert blot-pufferben áztatjuk 5 percig (az agarózgél az elektroforézis után nem igényel semmilyen kezelést).

23.3.3. Összeállítjuk a blot-rendszert.
Elektroblot: 27 V, 2 A, 5 °C, 2 óra, a blot-puffer áramoltatásával.

23.3.4. A blot befejezése után a nitrocellulóz-filtert szobahőn szárítjuk, majd az RNS-t a filterre sütjük, Whatman 3MM-szűrőpapírlapok közé helyezve.
Inkubálás: 80 °C, 2 óra.

23.4. Hibridizálás

23.4.1. Prehibridizálás: a filtert prehibridizáló-oldatba helyezzük.
Inkubálás: 42 °C, 20 perc.

23.4.2. Hibridizálás: a filtert áttesszük a hibridizálóoldatba.
Inkubálás: 42 °C, 16 óra.

23.5. A filtert a következő oldatok 150 ml-eiben mossuk:
2 x SSPE + 0,1% SDS-oldatban, 2 x 10 percig, szobahőn,
majd
0,1 x SSPE + 0,1% SDS-oldatban, 2 x 10 percig, szobahőn,
majd
0,1 x SSPE + 0,1% SDS-oldatban, 1 x 1 órán át, 42 °C-on.

23.6. Detektálás: a még enyhén nedves filtert műanyag fóliába (folpack) csomagoljuk és Röntgen-kazettába zárjuk Röntgen-filmet helyezve rá.
Exponálás: 1 nap, -70 °C, "screen"-eléssel.

24. Fehérjetérképezés; HSA hasítása cianogén-bromiddal(CNBr)

(Barsh és Byers, 1981)

Anyagok és oldatok

CNBr-oldat:	70% hangyasav	5	ml	
	CNBr	50	mg/ml	
TGB:	Trisz-HCl	100	mM	(pH 6,8)
	glicerol	30	% (v/v)	
	brómfenolkék	0,02	%	
Trisz-SDS:	Trisz-HCl	100	mM	
	SDS	5	%	
	glicerol	20	%	
	brómfenolkék	0,02	%	

Munkamenet

24.1. A térképezni kívánt fehérjemintát SDS-poliakrilamidgél-elektroforézissel mólsúly szerint elválasztjuk (20. pont).

24.2. A vizsgálni kívánt fehérjét tartalmazó gélcsíkot az elektroforézis után azonnal kivágjuk.

24.3. A gélcsíkot equilibráljuk 15-szörös térfogatú, 70%-os hangyasavban, 3 x 30 percig.

24.4. A gélcsíkot 5 ml CNBr-oldatba helyezzük.
Inkubálás: 25 °C, 6 óra.

24.5. A CNBr-emésztés után a gélcsíkot TGB-ben equilibráljuk, majd vízszintesen ráhelyezzük a második poliakrilamidgél tetejére (a stacking-gélre).

24.6. A gélcsík köré Trisz-SDS-t rétegzünk.
Elektroforézis: 20 mA.

25. HSA termelése Bioflo IIc (New Brunswick) típusú laboratóriumi fermentorban

A fermentor hasznos térfogata: 1 l.
Fermentációs táptalaj: YNBCA (pH 6,3).
Hőmérséklet: 30 °C.
Levegőáram: 1 l/perc.
Keverő fordulatszáma: 500 rpm.
Habgátló: polipropilén-glikol 2000 (szükség esetén automata adagolással).

EREDMÉNYEK

1. A szintetikus úton előállított *HSA*-gént hordozó expressziós vektor konstrukciója

1.1. A *PHO5*-promóter klónozása

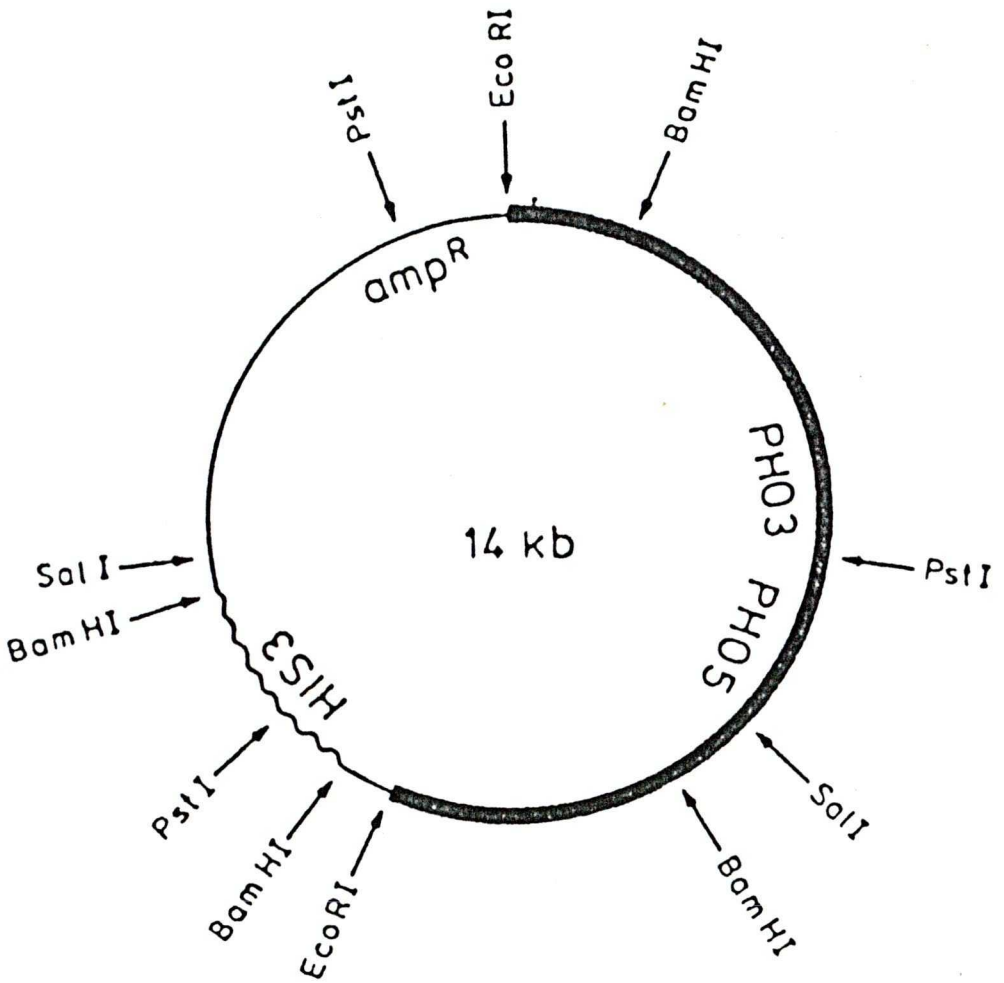
A represszálható savanyú foszfatáz (SF) exoenzimet kódoló *PHO5*-gén promóterét a pBR322(HIS3)/PHO3,PHO5-plazmidból (3. ábra; Meyhack és mtsi., 1982) *Bam*HI- és *Sal*I-restrikciós enzimmel vágtuk ki. Az így kapott 623 bp hosszúságú DNS-szakasz tartalmazza a *PHO5*-promótert, a 17 aminosavból álló N-terminális szekréciós szignálpeptidet kódoló DNS-szakaszt, valamint a SF tíz N-terminális aminosavát kódoló DNS-szakaszt. A DNS-fragmentet a pUC18-vektor *Bam*HI- és *Sal*I-restrikciós hasítóhelye közé beépítve, megkaptuk a pUC18/623P-plazmidot (4. ábra).
A *PHO5*-gén szekréciós szignálpeptidjét a következő szekvencia kódolja:

```
                 Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu
   PROMÓTER-     ATG TTT AAA TCT GTT GTT TAT TCA ATT TTA
BamHI                 DraI

            Ala Ala Ser Leu Ala Asn Ala Gly Thr
            GCC GCT TCT TTG GCC AAT GCA^GGT ACC
                            BalI        |   KpnI
                                        |
                                    Szignálpeptidáz-
                                    hasítóhely
```

A HSA-t kódoló gént a szignálpeptid után (downstream) helyet foglaló *Kpn*I-helyre terveztük beépíteni. Ehhez előbb a pUC18/623P-plazmid térképén x-szel megjelölt (második) *Kpn*I-hasítóhelyet el kellett távolítani. Ennek érdekében a plazmidot *Sac*I- és *Bam*HI-restrikciós endonukleázzal hasítottuk. A *Pol*I K-kezeléssel kialakított sima végek ligálásával kaptuk a pUC18*/623P-plazmidot, amelyben a *Bam*HI-hasítóhely visszaalakult, a szignálvégnél elhelyezkedő *Kpn*I-hely pedig alkalmassá vált a további "építkezés" elvégzésére.

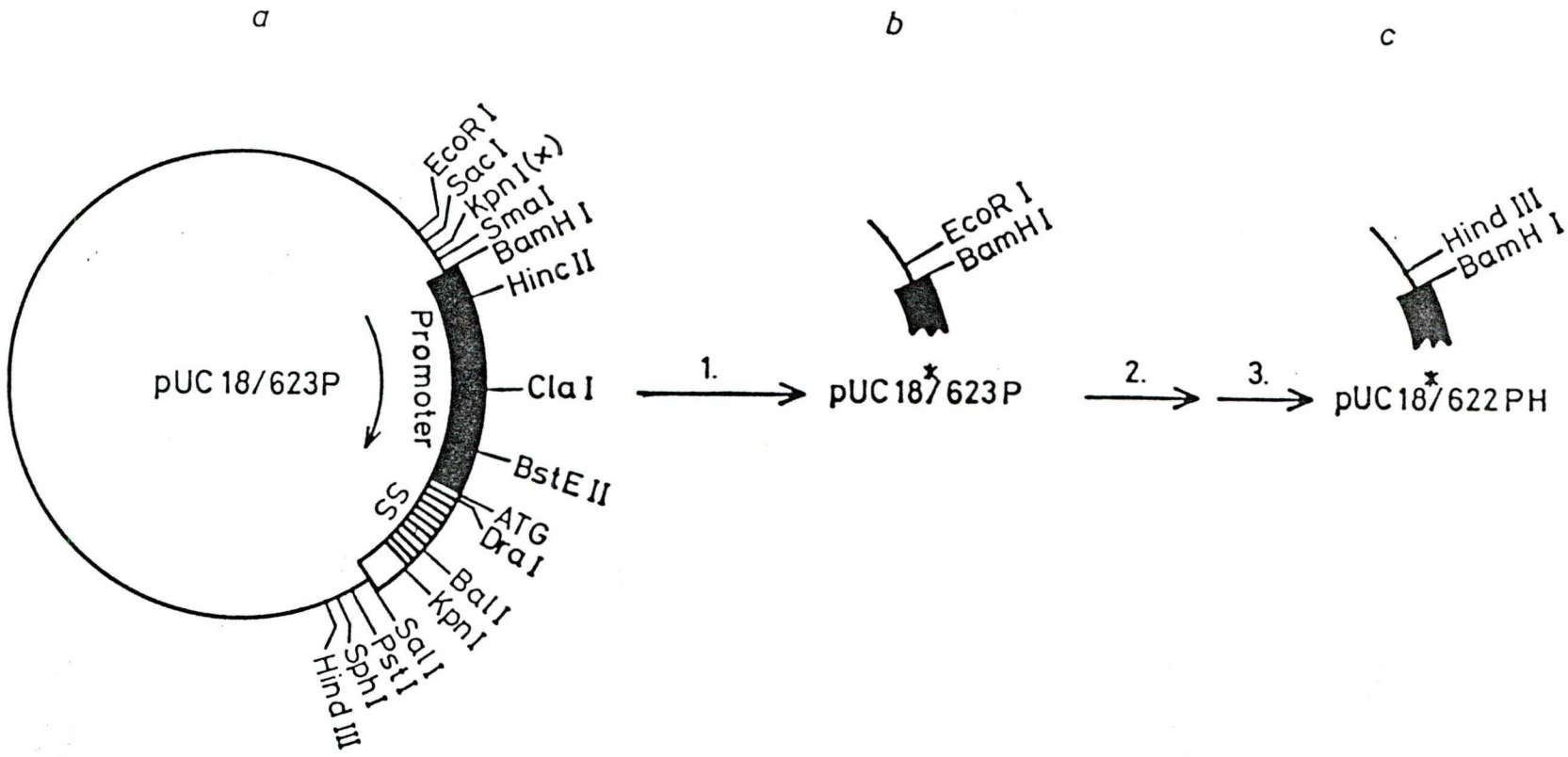
1.2. A szekréciós szignálpeptid módosítása

A szignálpeptid utolsó kodonjával fázisban restrikciós hasítóhelyet kellett kialakítanunk, mely biztosította, hogy a *HSA* kezdő tripletje (GAC) korrekt



3. ábra
A teljes *PHO5*- és *PHO3*-gént tartalmazó **pBR322(HIS3)/PHO3,PHO5**-plazmid (Meyhack és mtsi., 1982)

Szegedi Biológiai Központ



4. ábra
A **pUC18/623P**-plazmid átalakításának lépései:

1. az x-szel jelölt *Kpn*I-hasítóhely eltávolítása
2. a szignálpeptid után elhelyezkedő *Kpn*I-hasítóhely áthelyezése 1 nukleotiddal
3. az *Eco*RI-hasítóhely átalakítása *Hind*III-hasítóhellyé

ss:szignálszekvencia

leolvasási fázisban legyen a *PHO5*-szignált kódoló szekvenciával. Ezt úgy értük el, hogy a *Kpn*I-hasítóhelyet 1 nukleotiddal áthelyeztük 3' - 5' irányba. A *Kpn*I-hely fölött (upstream) elhelyezkedő adenin (A) eltávolítása adta ezt az eltolódást úgy, hogy nem okozott változást az aminosavsorrendben a *Kpn*I-hasítóhelyig:

Ser Leu Ala Asn Ala Gly Thr
TCT TTG GCC AAT GCAGGT ACC A...
*Bal*I *Kpn*I
Szignálpeptidáz-hasítóhely

A felesleges **A** eltávolítása érdekében a pUC18*/623P-plazmid *Bal*I - *Kpn*I-szakaszát (CCAATGCAGGTAC)
(GGTTACGTC) a szintetikus C CAATGC GGTAC
G GTTACG C
kétszálú oligomerre cseréltük ki, mely a pUC18*/622P-plazmidot eredményezte. A releváns szakasz bázissorendje tehát az átalakítás után:

Ser Leu Ala Asn Ala Val
TCT TTG GCC AAT GCG GTA CCA
*Kpn*I

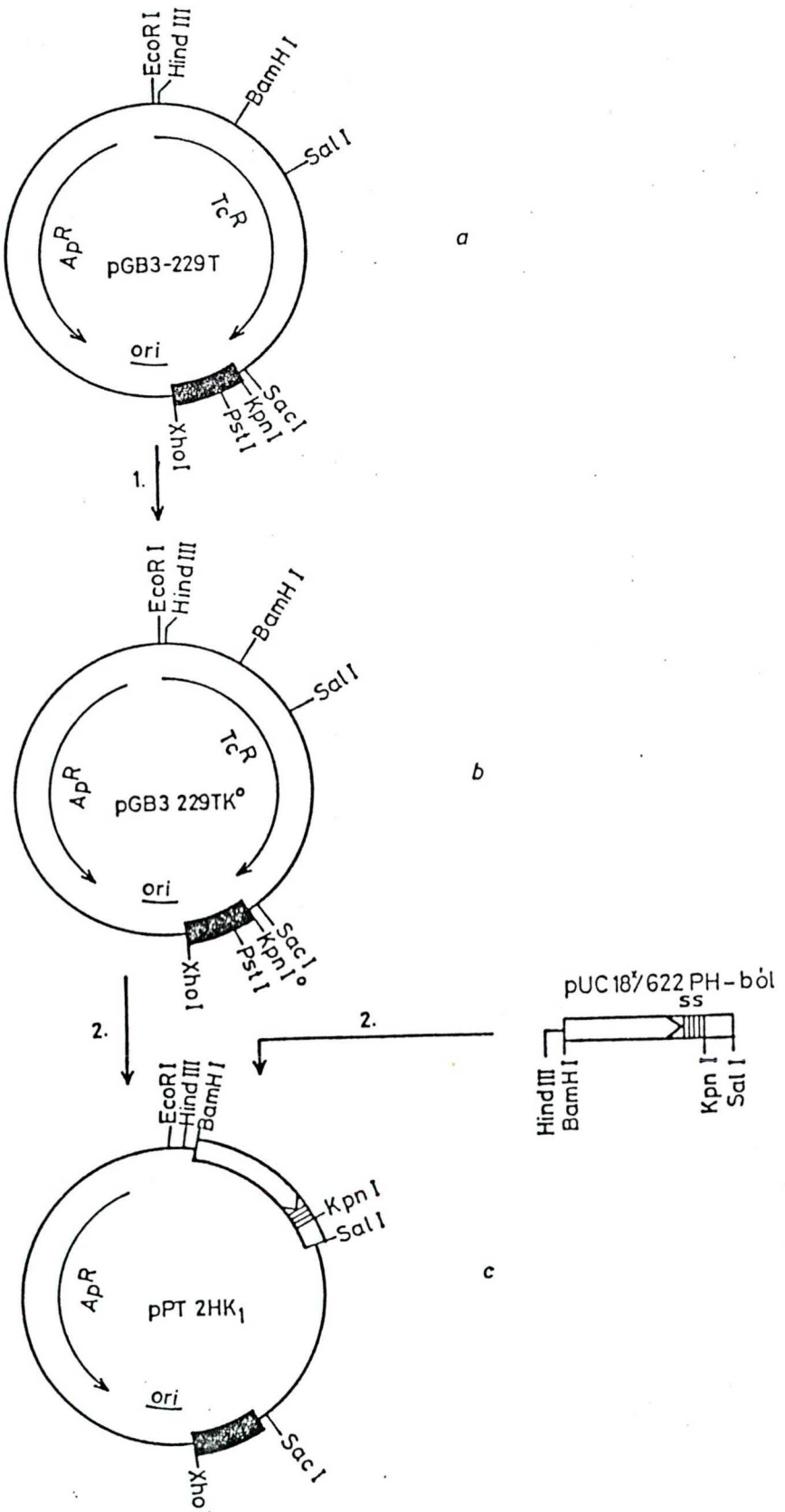
A módosított szekvenciát *Kpn*I-enzimmel hasítva, majd a túlnyúló GTAC-3' véget *Pol*I K-kezeléssel eltávolítva kaptuk azt a sima véget, melyhez az idegen gén fázisban illeszthető volt sima vég-ligálással. A későbbre tervezett klónozási lépések egy további módosítást is szükségessé tettek: az *Eco*RI-hasítóhelyre *Hind*III-linkert kellett beépíteni. Az így kapott plazmid: pUC18*/622PH (4. ábra).

1.3. A *HIS3*-gén transzkripciós terminátorának klónozása

A pGB3-plazmid egy pBR327-származék, melybe a *Kpn*I- és *Xho*I-hasítóhely közé helyeztük el a 229 bp hosszúságú transzkripciós terminátor génszakaszt (a *HIS3*-terminátort ugyancsak a pBR322(HIS3)/PHO3,PHO5-plazmidból nyertük), a pGB3-229T-plazmidot kapva eredményül (5. ábra).

1.4. Élesztő expressziós kazetta kiépítése

Miután a pGB3-229T-plazmidból a *Kpn*I-hasítóhelyet eltávolítottuk (*Kpn*I-hasítás, *Pol*I K-kezelés, ligálás) az ily módon nyert pGB3-229TK°-plazmidba a *Hind*III- és *Sal*I-hasítóhely közé beillesztettük a pUC18*/622PH-plazmid *Hind*III - *Sal*I-fragmensét, mely a *PHO5*-promótert és -szekréciós szignált hordozza (5. ábra).



5. ábra
Heterológ fehérjét kódoló génszakaszt nem tartalmazó expressziós vektor kialakítása:

1. a *Kpn*I-hasítóhely eltávolítása a *HIS3*-terminátort hordozó **pGB3-229T**-plazmidból
2. a *PHO5*-promóter és -szignálszekvencia beépítése.

Az így kialakított pPT2HK1-plazmid (6. ábra) tehát egy olyan expressziós vektor, amely heterológ fehérjét kódoló génszakaszt még nem tartalmaz.

1.5. A *HSA*-gén beépítése az expressziós vektorba

Az 1764 bp hosszúságú szintetikus *HSA*-gént (7. ábra) a pUC19/HSA-plazmidból vágtuk ki, melyet az SZBK Genetikai Intézetében Simoncsits András és munkatársai konstruáltak (Kálmán és mtsi., 1990). A pUC19/HSA-ból az érett peptidet (Asp-Ala-HSA) kódoló *HSA*-gén *Pst*I-, *Pol*I K- és *Sac*I-kezeléssel hasítható ki. A struktúrgént úgy helyeztük be a pPT2HK1-plazmidba a promóter/szignálszekvencia és a transzkripciós terminátor közé, hogy a plazmidot *Kpn*I-, *Pol*I K- és *Sac*I-kezeléssel linearizáltuk, és a sima, ill. *Sac*I-véggel rendelkező, HSA-t kódoló DNS-szakaszhoz ligáltuk (8. ábra). Az így kialakított pPT2/HSA-2-plazmidban (9. ábra) a *PHO5*-szekréciós szignált kódoló génszakasz és a szintetikus *HSA*-gén kapcsolódása - az aminosavsorrendet is feltüntetve - :

PHO5-szekréciós szignálszekvencia.....

... Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala

... ATG TTT AAA TCT GTT GTT TAT TCA ATT TTA GCC GCT

*Dra*I

.....érett HSA.....

Ser Leu Ala Asn Ala Asp Ala His Lys Ser Glu ...

TCT TTG GCC AAT GCG GAC GCT CAC AAG TCT GAA ...

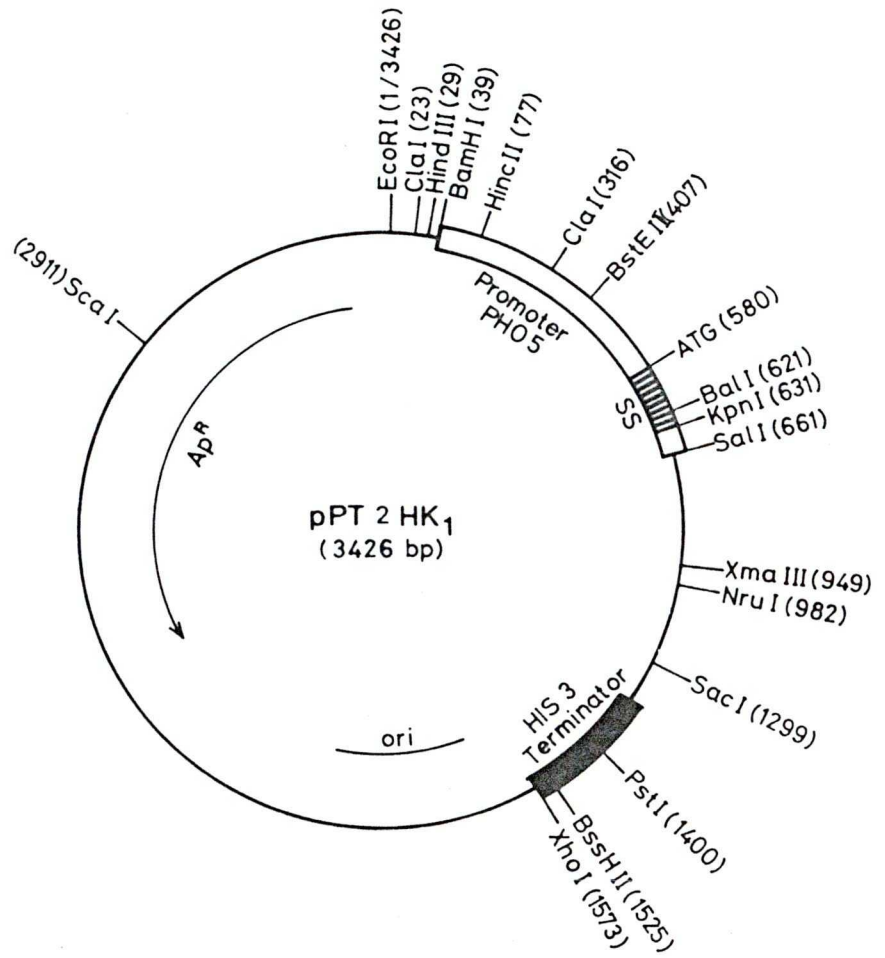
*Bal*I

szignálpeptidáz-hasítóhely

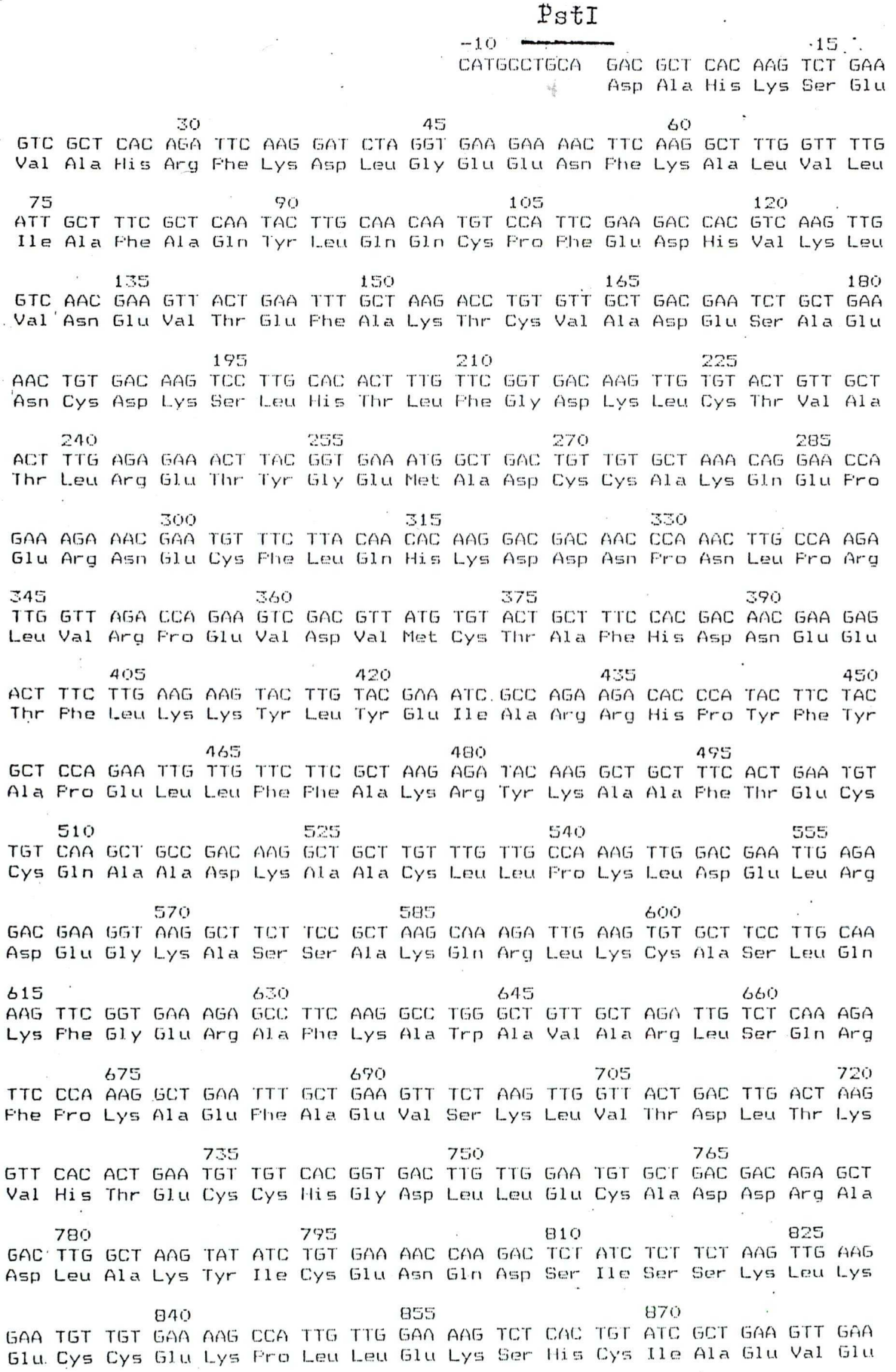
A pPT2/HSA-2-ből a HSA-expressziós szekréciós kazettát át kellett klónozni egy élesztővektorba.

1.6. A HSA-t expresszáló ingázóplazmid létrehozása

Az expressziós-szekréciós kazettát *Hind*III- és *Xho*I-hasítással kiemeltük a pPT2/HSA-2-plazmidból, és behelyeztük a *Hind*III- és *Sal*I-enzimmel hasított pJDB207-ingázóvektorba (Beggs, 1981; 9. ábra). A keletkezett **pYHSA-2**-plazmidot *E. coli*-ban ampicillinrezisztencia alapján szelektáltuk. A plazmidot hordozó sejtek szelekcióját élesztőben az alacsony szinten működő *Leu2d*-gén (Andreadist és mtsi., 1984; Bitter és mtsi., 1987) biztosította, mely egy deléciós mutáns: mind a gén promótere, mind a transzkripciós terminátor régiója hiányzik.



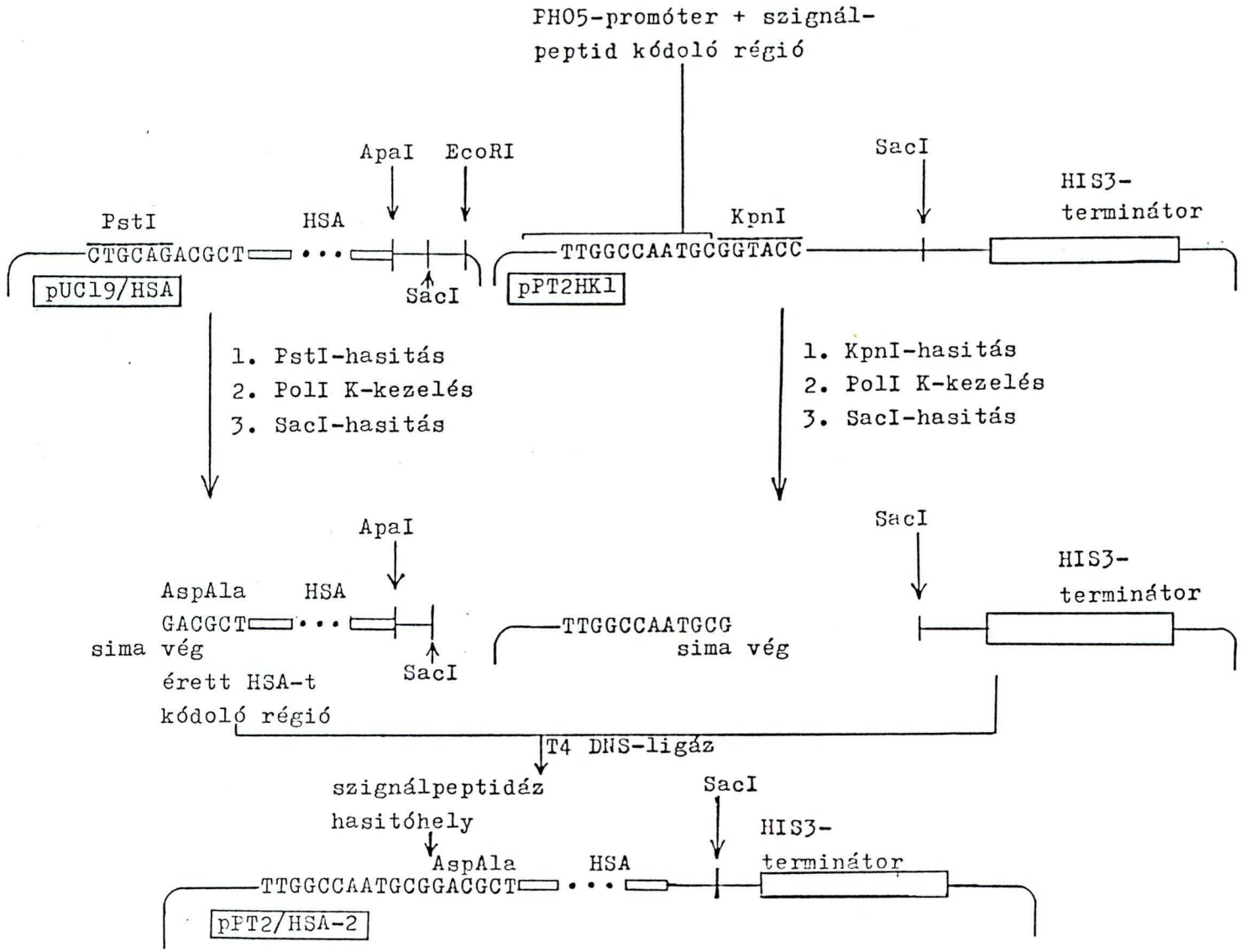
6. ábra
A *PHO5*-promótert és -szignálszekvenciát, valamint a *HIS3*-terminátort tartalmazó expressziós vektor részletes térképe



7. ábra
A szintetikus *HSA*-gén nukleotidszekvenciája a kódolt fehérje aminosavsorrendjének feltüntetésével

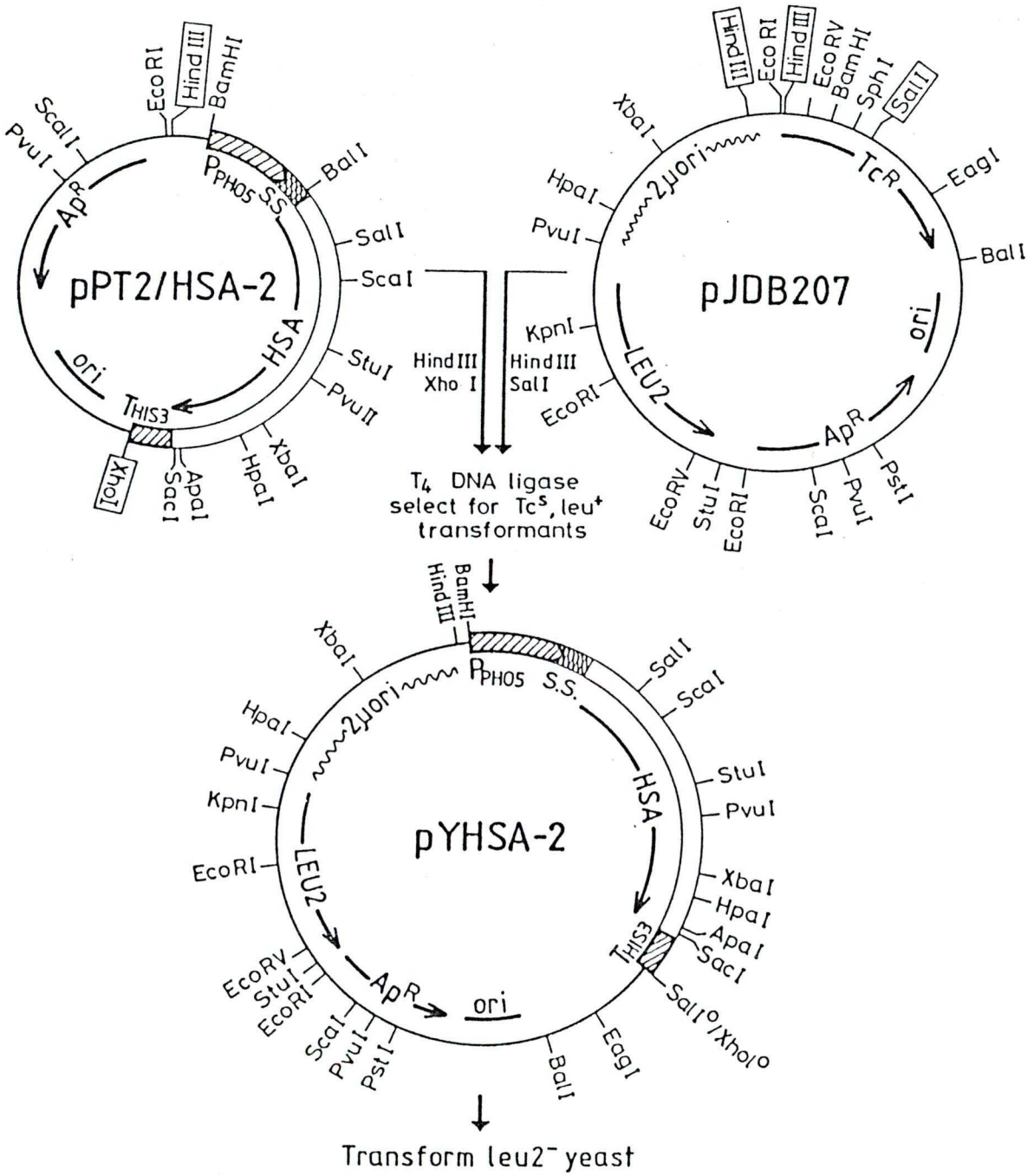
```
885                 900                 915                 930
AAC GAC GAA ATG CCA GCT GAC TTG CCA TCT TTG GCT GCT GAC TTC GTT GAA TCT
Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser

        945                 960                 975                 990
AAG GAC GTT TGT AAG AAC TAC GCT GAA GCT AAG GAC GTT TTC TTG GGT ATG TTC
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe

                1005                1020                1035
TTG TAC GAA TAC GCT AGA AGA CAC CCA GAC TAC TCC GTT GTT TTG TTG TTG AGA
Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg

    1050                1065                1080                1095
TTG GCT AAG ACT TAC GAA ACT ACT TTG GAA AAG TGT TGT GCT GCT GCT GAC CCA
Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro

            1110                1125                1140
CAC GAA TGT TAC GCT AAG GTT TTC GAC GAA TTT AAG CCA TTG GTT GAA GAA CCA
His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro

1155                1170                1185                1200
CAA AAC TTG ATT AAG CAA AAC TGT GAA TTG TTC AAG CAA TTG GGT GAA TAC AAG
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys Gln Leu Gly Glu Tyr Lys

        1215                1230                1245                1260
TTC CAA AAC GCT TTG TTG GTT AGA TAC ACT AAG AAG GTT CCA CCA GTC TCC ACT
Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Pro Val Ser Thr

                1275                1290                1305
CCA ACT TTG GTT GAA GTC TCT AGA AAC TTG GGT AAG GTT GGT TCT AAG TGT TGT
Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys

    1320                1335                1350                1365
AAG CAC CCA GAA GCT AAG AGA ATG CCA TGT GCT GAA GAC TAC TTG TCT GTT GTT
Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val

            1380                1395                1410
TTG AAC CAA TTA TGT GTT TTG CAC GAA AAG ACT CCA GTT TCT GAC AGA GTT ACT
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr

1425                1440                1455                1470
AAG TGT TGT ACT GAA TCT TTG GTT AAC AGA AGA CCA TGT TTC TCT GCC TTG GAA
Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

        1485                1500                1515                1530
GTT GAC GAA ACT TAC GTC CCA AAG GAA TTT AAC GCT GAA ACT TTC ACT TTC CAC
Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His

                1545                1560                1575
GCC GAC ATC TGT ACC TTG TTC GAA AAG GAA AGA CAA ATC AAG AAG CAA ACT GCT
Ala Asp Ile Cys Thr Leu Phe Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

    1590                1605                1620                1635
TTG GTT GAA TTG GTT AAG CAC AAG CCA AAG GCT ACT AAG GAA CAA TTG AAG GCT
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala

            1650                1665                1680
GTT ATG GAC GAC TTC GCT GCT TTC GTT GAA AAG TGT TGT AAG GCT GAC GAC AAG
Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys

1695                1710                1725                1740
GAA ACT TGT TTC GCT GAA GAA GGT AAG AAG TTG GTT GCT GCT TCT CAA GCT GCT
Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala

        1755                1770        1780
TTG GGT TTG TAA TAG G GCCCTGGA  GCTCAGTCTG
Leu Gly Leu  *   *              SacI
```

7. ábra folytatása



8. ábra

A szintetikus *HSA*-gén behelyezése az expressziós kazettába



9. ábra
HSA-t expresszáló ingázóplazmid kialakításának folyamata

A deléciók következményeként a *Leu2d*-gén leucinauxotrófiát komplementáló hatása csak akkor érvényesül, ha a gén, azaz a gént tartalmazó plazmid nagy kópiaszámban van jelen a sejtben.
A klónozási lépések során az egyes génszakaszok megfelelő illeszkedését DNS-szekvenálással ellenőriztük. (A szekvenálási munkákban Berecz Erzsébet és Jósvay Katalin [Biotechnika R.T.] voltak segítségemre.) Megállapítottuk, hogy a pUC18/623P-plazmidban a 623 bp hosszúságú *Bam*HI - *Sal*I-DNS-szakasz *Sal*I-restrikciós hasítóhely felőli végének nukleotidsorrendje a következő :

CAAGCAAATT CGAGATTACC AATGTTTAAA TCTGTTGTTT ATTCAATTTT AGCCGCTTCT TTGGCCAATG CAGGTACCAT TCCCTTAGGC AAACTAGCCG ATGTCGAC
*Sal*I

A szekvencia megegyezik az irodalomban közölt szekvenciával (Bajwa és mtsi., 1984; vö. az 1.1. pontban leírt szekvenciaadatokkal is).
A pUC18*/622P-plazmid releváns szakaszának szekvenciaanalízise igazolta, hogy a *PHO5*-szignálszekvencia N-terminális végét kódoló DNS-szakasz átalakítása sikerrel járt: lásd az 1.2. pontban leírt szekvenciaadatokat.
A pPT2/HSA-2-plazmid HSA-primerrel történő szekvenciaanalízisekor a következő nukleotidsorrendet kaptuk:

TCATGAGAAT AAGAACAACA ACAAATAGAG CAAGCAAATT CGAGATTACC AATGTTTAAA TCTGTTGTTT ATTCAATTTT AGCCGCTTCT TTGGCCAATG CGGACGCTCA CAAGT

A szekvencia megfelel a *PHO5*-promóter 3'-végének, a módosított *PHO5*-szignálszekvenciának és az azt követő érett HSA első aminosavait kódoló nukleotidsorrendnek (vö. az 1.5. pontban leírt szekvenciával).

2. A HSA-expressziós vektorral transzformált rekombináns élesztő vizsgálata

2.1. A HSA-expresszió körülményei a rekombináns élesztősejtekben

A **pYHSA-2**-HSA-expressziós vektorral transzformált *Saccharomyces cerevisiae* LL20-rekombináns sejtkolóniákat (YHSA221) szelektív tápoldatban, indukált körülmények között növesztettük. Nyolcvan órán keresztül figyeltük a következő paraméterek alakulását: sejtdenzitás; a tápoldat pH-jának és inorganikus

foszfát(Pi)-koncentrációjának változása; a sejtlizátumok HSA-tartalma (félkvantitatív ELISA-teszttel meghatározva).
A 10. ábra mutatja be a mérések eredményeit. A sejtek a kis Pi-koncentrációjú YNB-tápoldatban 40-44 óra elteltével érték el a stacionáris növekedési fázist. Ezalatt a tápoldat Pi-koncentrációja 30 mg/l-ről 2 mg/l-re csökkent, aminek következtében a *PHO5*-promóter derepresszált körülmények közé került, és a sejtek megkezdték a HSA aktív szintézisét. A HSA-termelődés a 60. órában érte el a maximumát, mely szint további 12-15 órán át fennmaradt.

2.2. A HSA-termelő élesztősejtekből (YHSA221) izolált plazmid-DNS vizsgálata

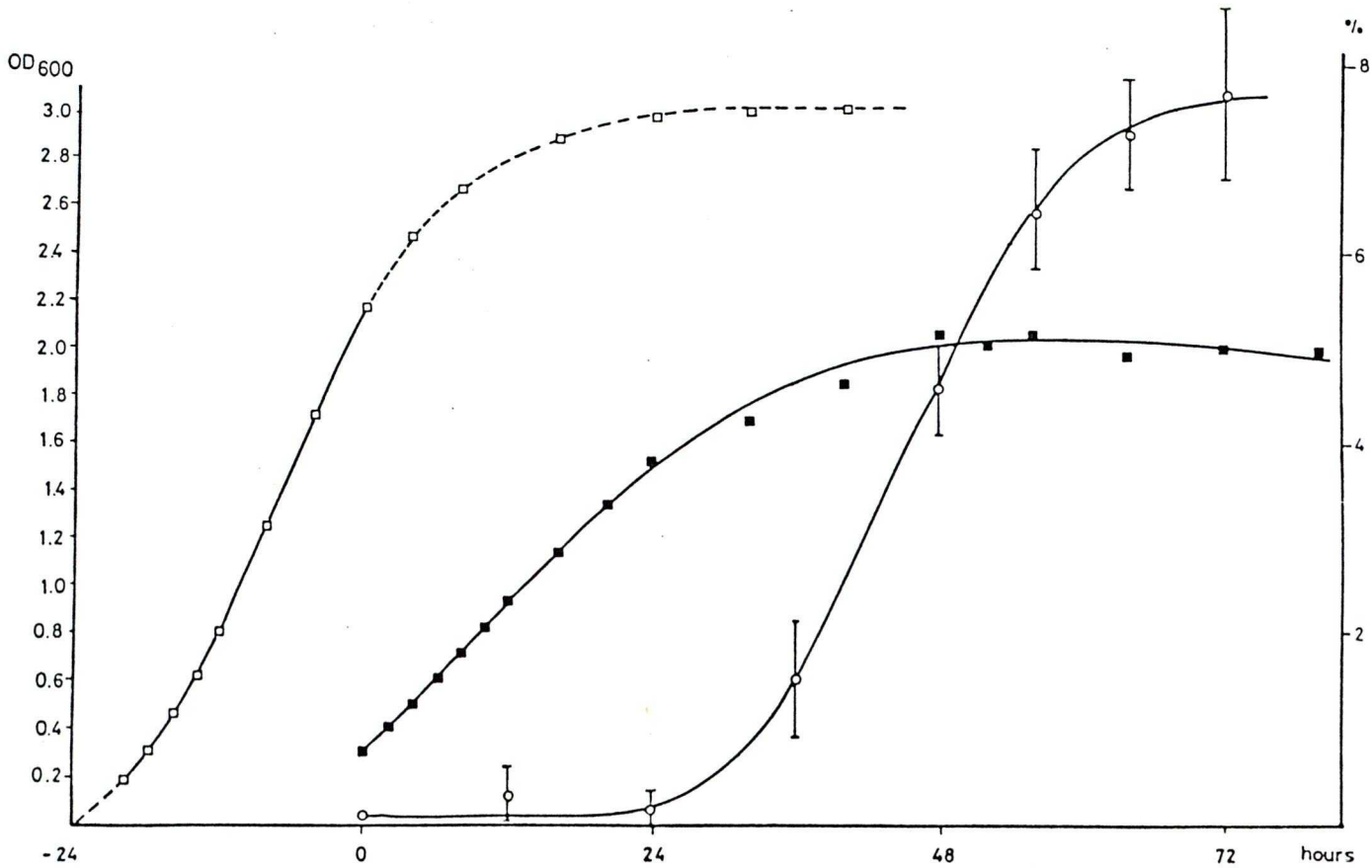
További bizonyítékául annak, hogy a tanulmányozott transzformáns sejtvonalak valóban tartalmazták a HSA-expressziós vektort, a rekombináns sejtekből izolált plazmid-DNS-t agarózgél-elektroforézissel analizáltuk.
A 11. ábra bemutatja két rekombináns élesztő sejtvonalban a transzformáló plazmid jelenlétét. A DNS - *Hind*III-restrikciós enzimmel kezelve, mely a **pYHSA-2**-HSA-expressziós vektorban egyszeri restrikciós hasítást (linearizálást) eredményez - a megfelelő 8 kbp molekulahossz-tartományban jelent meg.
A vizsgálat a transzformáló plazmid jelenléte mellett, annak nagy kópiaszámát is bizonyította, ugyanis csak így volt lehetséges, hogy a közvetlenül az élesztősejtekből történő plazmid-DNS-preparálás agarózgélen látható mennyiségű DNS-mintát eredményezett.

2.3. A HSA-specifikus transzkriptum kimutatása

A HSA-specifikus mRNS aktív transzkripcióját Northern-blot-analízissel mutattuk ki.
A Northern-blot eredményei (12. ábra) alapján megállapítottuk, hogy a rekombináns élesztősejtekben egyetlen foszfátmegvonással indukálható HSA-specifikus mRNS-transzkriptum keletkezett, melynek hossza 1,9-2,0 kbp, és amely a foszfátmegvonással indukált sejtkultúrában sokkal nagyobb mennyiségben szintetizálódott.
A Northern-blot-hibridizációval kimutatott HSA-specifikus transzkriptum mérete jó közelítésben megegyezett az mRNS számított hosszúságával.

2.4. A rekombináns HSA (rHSA) tisztítása

A további vizsgálatok szükségessé tették egy olyan új, laboratóriumi szintű tisztítási eljárás kidolgozását, mely gyakorlatilag tökéletes tisztaságú rHSA-t eredményez.



10. ábra
A **pYHSA-2**-HSA-expressziós vektorral transzformált rekombináns élesztősejtek (YHSA221) HSA-termelésének vizsgálata

0 órával jelöltük a *PHO5*-promóter indukciójának időpontját, amikor az élesztőkultúrát kis Pi-koncentrációjú szelektív tápoldatba helyeztük át.

: sejtnövekedés nagy Pi-koncentrációjú YNB + His-tápoldatban

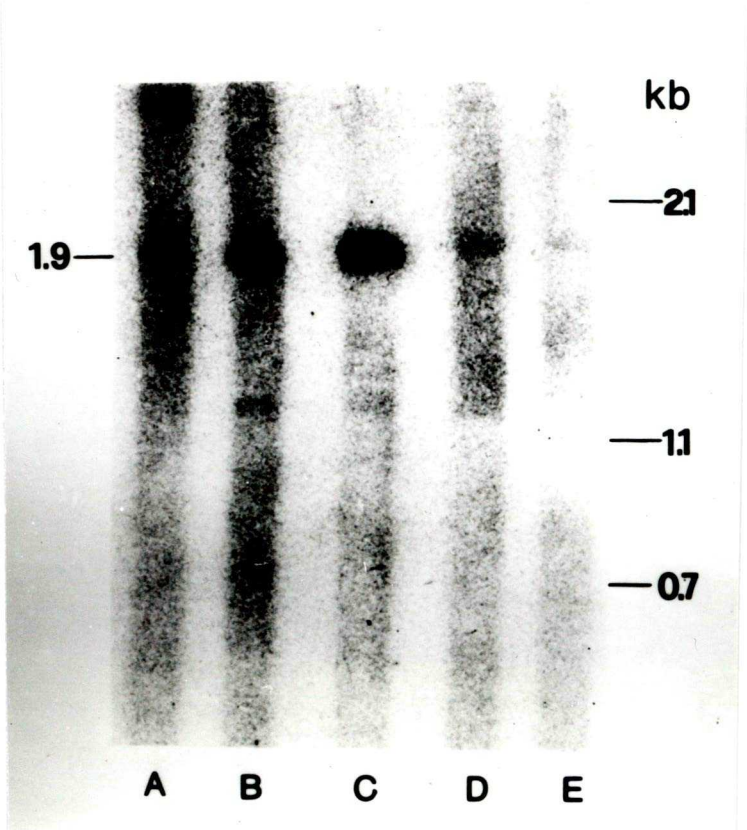
: sejtnövekedés kis Pi-koncentrációjú YNB + His-tápoldatban

: a HSA aránya az összes sejtfehérjéhez képest

11. ábra
YHSA221-élesztőből izolált DNS tanulmányozása agarózgél-elektroforézissel

a, c: két rekombináns sejtvonalból tisztított DNS
b, d: a rekombináns sejtvonalakból tisztított DNS *Hind*III-enzimmel történő hasítás után
m: DNS-mólsúlymarker (*Hind*III-enzimmel emésztett lambda-fág-DNS)
e: nem transzformált LL20-élesztősejtekből tisztított DNS

lp: linearizált plazmid
ch: kromoszómális DNS
cp: cirkuláris plazmid



12. ábra
Northern-blot-analízis

^{32}P-vel jelölt *HSA*-génszakasz (921 bp, *Sal*I-*Xho*I szakasz) hibridizálása YHSA221-rekombináns élesztősejtekből tisztított mRNS-hez

(A: a dolgozatban nem említett expressziós vektorral transzformált, indukált sejtekből tisztított mRNS)
B, C: indukált YHSA221-sejtvonalakból tisztított mRNS
D, E: megegyezik B- és C-vel, de a sejttenyésztés indukció nélkül történt.

A módszer a következő tisztítási lépéseket foglalja magában:

2.4.1. Sejtlízis, fehérjék kicsapása

2.4.1.1. Rekombináns élesztősejteket OD_{600} = 2 eléréséig növesztettünk L-hisztidinnel kiegészített, nagy Pi-koncentrációjú, 0,1 M MES-sel (pH 6) pufferelt YNB-tápoldatban (30 °C, 24 óra).
2.4.1.2. A sejteket centrifugáltuk (4000 g, 5 perc) és a sejtcsapadékot szuszpendáltuk 4 l L-hisztidinnel kiegészített, kis Pi-koncentrációjú, pufferelt YNB-tápoldatban (a *PHO5*-promóter indukciója).
Inkubálás: 30 °C, erőteljes rázatással, 60 óra, OD_{600} = 1,8 - 2,0 eléréséig.
2.4.1.3. A sejteket centrifugáltuk (4000 g, 5 perc), kétszer mostuk jéghideg desztillált vízzel, majd szuszpendáltuk 80 ml K-foszfát-pufferben (0,1 M K-foszfát; 10 mM 2-merkaptoetanol; 1 M szorbitol; pH 5,4)
2.4.1.4. Az elegyhez 2% ß-glukuronidázt adtunk.
Inkubálás: 30 °C, enyhe rázatással, 40 perc.
2.4.1.5. A sejteket centrifugáltuk (5000 g, 10 perc), kétszer mostuk 1 M szorbitollal, majd szuszpendáltuk 40 ml Triton X-100-oldatban (0,1% Triton X-100; 0,1 mM PMSF; 500 mM NaCl; 20 mM Trisz-HCl; pH 7).
2.4.1.6. A szuszpenzióhoz adtunk 10 ml üveggyöngy-szuszpenziót (átmérő: 0,4 mm; Sigma) és erőteljesen kevertettük (Vortex) 3 percig.
2.4.1.7. A sejttörmeléket centrifugálással eltávolítottuk (10000 g, 10 perc, 4 °C).
2.4.1.8. A felülúszóból a Triton X-100-at Bio-Beads SM-2-gyanta (BIO-RAD) segítségével távolítottuk el (Holoway, 1973), az abszorbenset pedig Whatman GF-A-üvegszűrőn keresztül történő szűréssel távolítottuk el.
2.4.1.9. Az oldat pH-ját 5-re állítottuk 1 M HCl hozzáadásával, és a fehérjéket ammónium-szulfáttal kicsaptuk (a proteinek 60%-os telítettségnél csapódtak ki).
2.4.1.10. A fehérjecsapadékot centrifugáltuk (4500 g, 30 perc, 4 °C) és feloldottuk 50 ml 20 mM Trisz-HCl-oldatban (pH 7).

2.4.2. Differenciált frakcionálás

2.4.2.1. Az oldatot leszűrtük és 0,8 x 8 cm-es Blue Sepharose CL-6B-oszlopra (Pharmacia) vittük fel, melyet előzőleg ATE-oldattal (20 mM ammónium-szulfát; 20 mM Trisz-HCl [pH 7]; 0,5 mM EDTA; 5 mM DTT) equlibráltunk.
2.4.2.2. Az oszlopot ATE-oldattal (50 ml-es adagokban), majd kis ammónium-szulfát-koncentrációjú Na-foszfát-oldattal (50 mM Na-foszfát [pH 7]; 0,1 M ammónium-szulfát) mostuk át.
2.4.2.3. Az oszlophoz szorosan kötődő fehérjefrakciót, mely az rHSA-t is

tartalmazta, nagy ammónium-szulfát-koncentrációjú Na-foszfát-oldattal (50 mM Na-foszfát [pH 7]; 1,7 M ammónium-szulfát) eluáltuk.

2.4.3. Fast performance liquid chromatography (FPLC)

2.4.3.1. Az eluált frakciót közvetlenül Alkil Superose HR 5/5 FPLC-oszlopra vittük (Pharmacia, 8 mg fehérje megkötésére képes).
2.4.3.2. Az oszlopot nagy ammónium-szulfát-koncentrációjú Na-foszfát-oldattal mostuk, majd az oszlophoz kötődő fehérjéket csökkenő koncentrációjú ammónium-szulfát-oldattal eluáltuk.
Úgy tűnt, hogy az 1,2-1,0 M koncentrációtartományban eluálódó fakciók tartalmazzák az rHSA-t, ugyanis a kontroll (szérum) HSA ezen tartományban eluálódott az oszlopról.

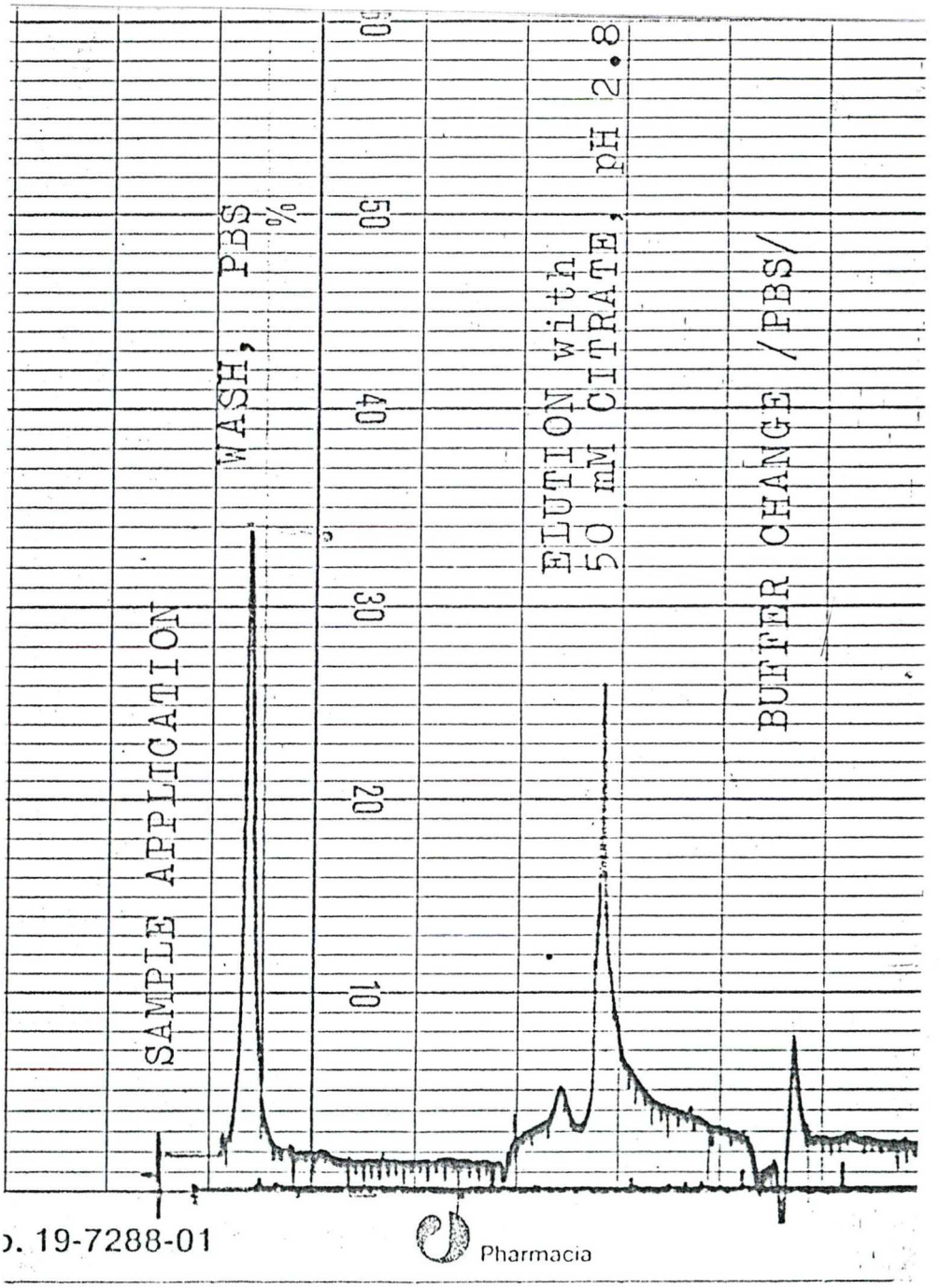
2.4.4. Immunaffinitás-kromatográfia

2.4.4.1. A frakciókat egy éjszakán keresztül dializáltuk PBS-sel szemben, majd a feltehetően rHSA-t tartalmazó mintát 0,5 x 4 cm-es immunaffinitás-kromatográfia-oszlopra vittük fel, mely hosszúláncú CPG-500-alkilamin-mátrixhoz kovalensen kötött anti-HSA-immunoglobulint tartalmazott.
2.4.4.2. Az oszlopot 0,5 M NaCl-ot és 0,05% Nonidet P-40-et (pH 8,2; Sigma) tartalmazó PBS-pufferoldattal mostuk, majd az oszlophoz kötődő rHSA-t citromsav-oldattal (50 mM; pH 2,8) eluáltuk az oszlopról (13. ábra).
2.4.4.3. Az eluátumot ultraszűréssel 0,5 ml-re töményítettük.
2.4.4.4. A puffert desztillált vízre cseréltük 0,6 x 25 cm-es Sephadex G-25(medium)-oszlopon.
2.4.4.5. Az anyagot fagyasztva szárítással teljesen betöményítettük.
(A tisztítás során a 4 l tápoldatból nyerhető rHSA mennyisége hozzávetőlegesen 12 mg volt. A kísérletek ezen első szakaszában célunk nem a mennyiségi termelés és pontos meghatározás volt, hanem annak bizonyítása, hogy rendszerünk képes autentikus HSA-t termelni.) (A tisztítási eljárás kidolgozásában és a tisztítási lépések kivitelezésében Niemi Hannu [Biotechnika R.T.] is részt vett.)

2.5. A tisztított rHSA molekuláris analízise

2.5.1. Mólsúlymeghatározás SDS-poliakrilamidgél-elektroforézissel

A rekombináns élesztősejtek lizátumából tisztított rHSA elektroforetikus képét



13. ábra
Az rHSA tisztításakor alkalmazott immunaffinitás-kromatográfia során kapott frakciók:

1. frakció: az oszlophoz nem kötődő anyagok
2. frakció: az oszlophoz lúgos pH-tartományban (pH 8.2) kötődő rHSA eluálása.

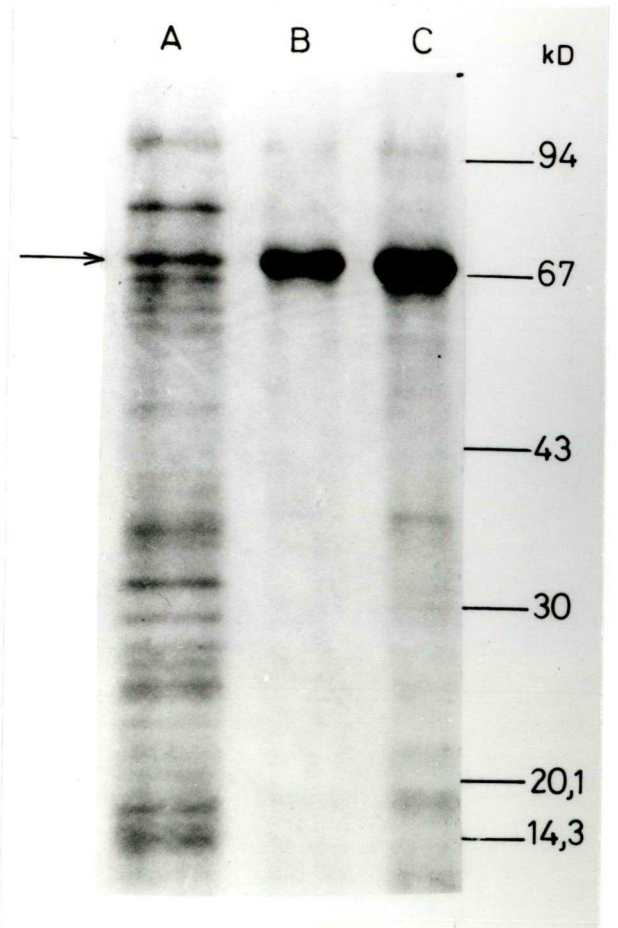
mutatja be a 14. ábra.
A tisztítás során nyert egyetlen fehérje a 67 kD mólsúlytartományban futott (14.C), mely érték azonos a természetes HSA molekulasúlyával (14.B). Ez a 67 kD-os protein megtalálható a Blue Sepharose CL-6B-oszlopról eluálódó mintában (14.A; az ábrán nyíl mutatja), és nincs jelen a nem transzformált, kontroll élesztősejtek extraktumában (nincs bemutatva).

2.5.2. A tisztított rHSA immuno(Western)-blot-analízise

A 15. ábrán demonstrált Western-blot-analízis során SDS-PAGE-módszerrel mólsúly szerint elválasztott, majd nitrocellulóz-filterre átvitt rekombináns fehérjeminták tisztítása megegyezik a 2.4. pontban leírtakkal, de a sejtfeltárás kétféle módon történt: az üveggyöngyös rázatással párhuzamosan ismételt ultrahangos kezelést is kipróbáltunk. A kapott immuno-blot-mintázat tovább erősítette azt a feltételezésünket, hogy a rekombináns sejtek által termelt fehérjék között a rekombináns HSA is megtalálható, hiszen a sejtekből tisztított fehérjék (15.A, 15.B) a természetes HSA-val (15.C) azonos immunológiai reakciót adtak, a természetes HSA-val megegyező mólsúlytartományban. Az ultrahangos sejtfeltárással készített sejtlizátumból tisztított mintában (15.B) egy kis mennyiségű, kb. 70 kD mólsúlyú immunreaktív fehérjecsík is megjelent. Ezt azzal magyaráztuk, hogy az ultrahangos kezelés sokkal alaposabb feltárást eredményezett, mint az üveggyöngyös eljárás, és míg az utóbbi esetben elsősorban a periplazmatikus térbe szekretált érett fehérjék szabadultak fel, addig az előbbiben a sejtek teljes beltartalma kiszabadult, amely hasítatlan (éretlen) HSA-t is tartalmazott.
A 16. ábrán látható Western-blot-analízis érdekessége, hogy a 2.4. pontban leírtaknak megfelelően tisztított rHSA anti-HBsAg-szérummal adott keresztreakcióját is bemutatja. Megállapítottuk, hogy a rekombináns HSA csak anti-HSA-szérummal reagált, mégpedig a megfelelő, 67 kD mólsúlytartományban (16.B), továbbá, hogy az anti-HSA-szérum nem reagált a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő által termelt rekombináns Hepatitis-B felszíni antigénnel (HBsAg; 16.C), tehát ellenanyagunk HSA-specifikus volt.

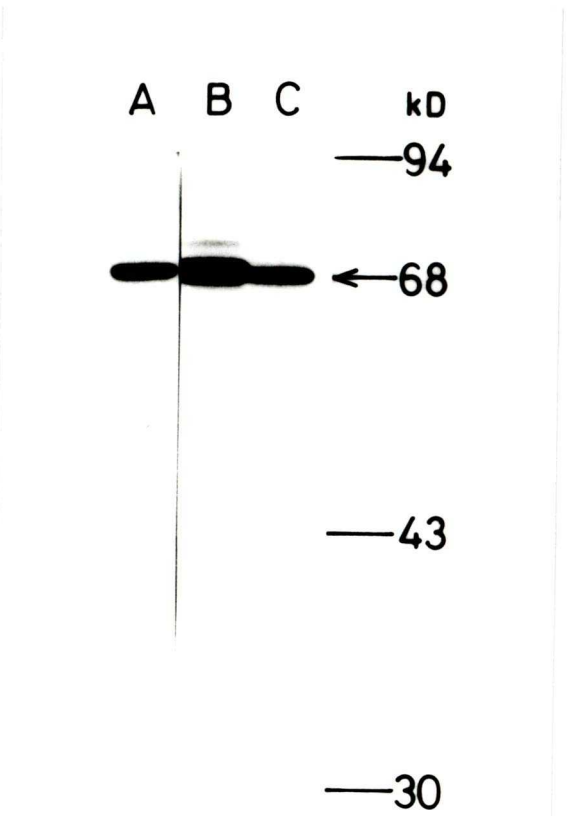
2.5.3. A rekombináns HSA lézerdenzitométeres vizsgálata

A rekombináns élesztősejtekből a 2.4. pontban leírtak szerint tisztított fehérjét természetes HSA-val párhuzamosan cianogén-bromid-hasításnak, majd a hasított fehérjéket lézerdenzitométeres vizsgálatnak vetettük alá. A 17. ábra mutatja be a vizsgálatok eredményét. A cianogén-bromid-kezelés a rekombináns fehérjét és a kontroll HSA-t azonos mólsúlyú fehérjefragmensekre hasította (17.C, 17.D). A



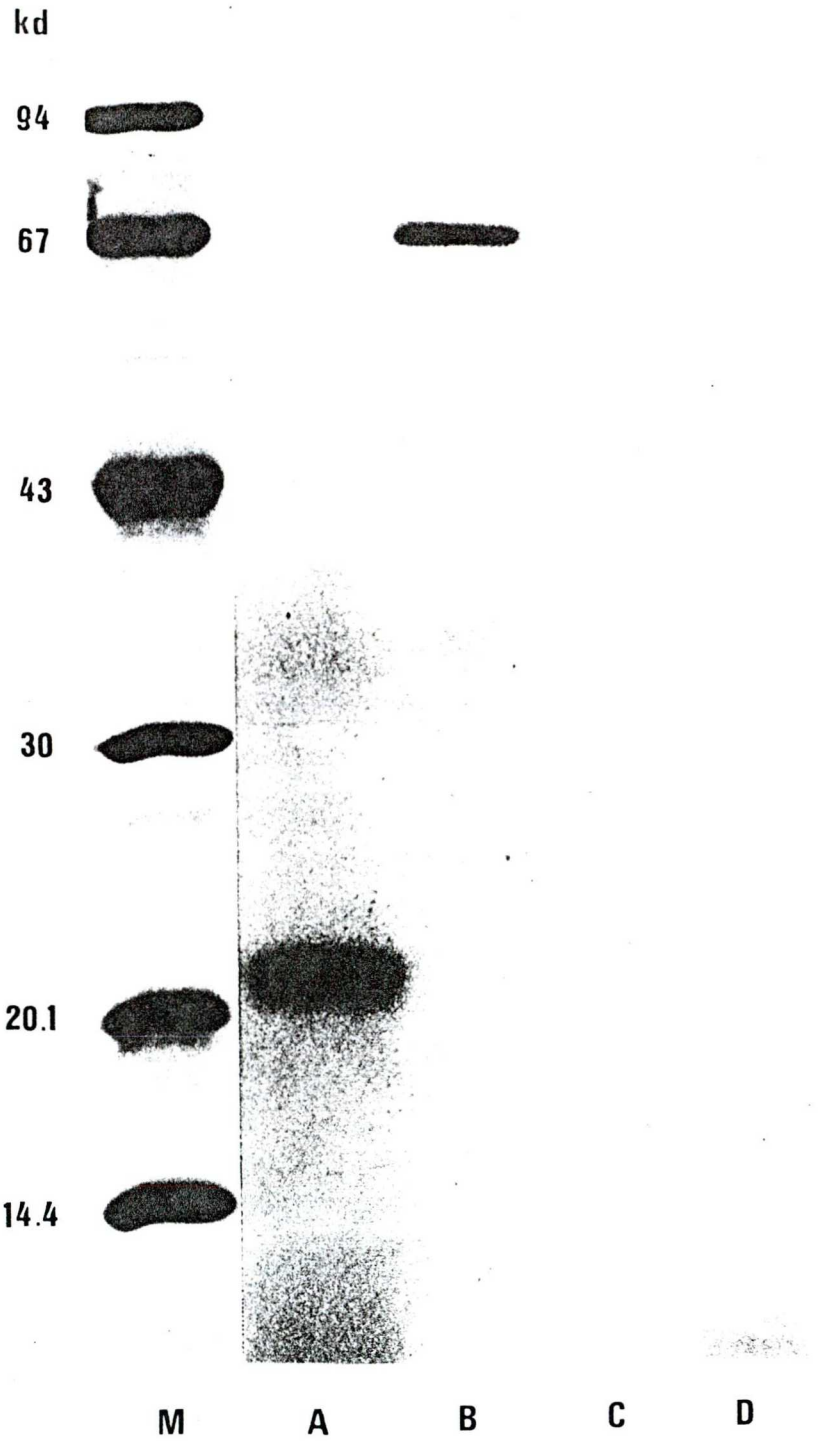
14. ábra
YHSA221-rekombináns élesztősejtekből tisztított fehérjék SDS-poliakrilamidgél-elektroforézise

A: az rHSA tisztítása során a Blue Sepharose CL-6B-oszlophoz kötődő fehérjék
B: kontroll (természetes) HSA
C: az A-ból Alkyl Superose HR 5/5-kromatográfiával és az azt követő immunaffinitás-kromatográfiával tisztított fehérje.



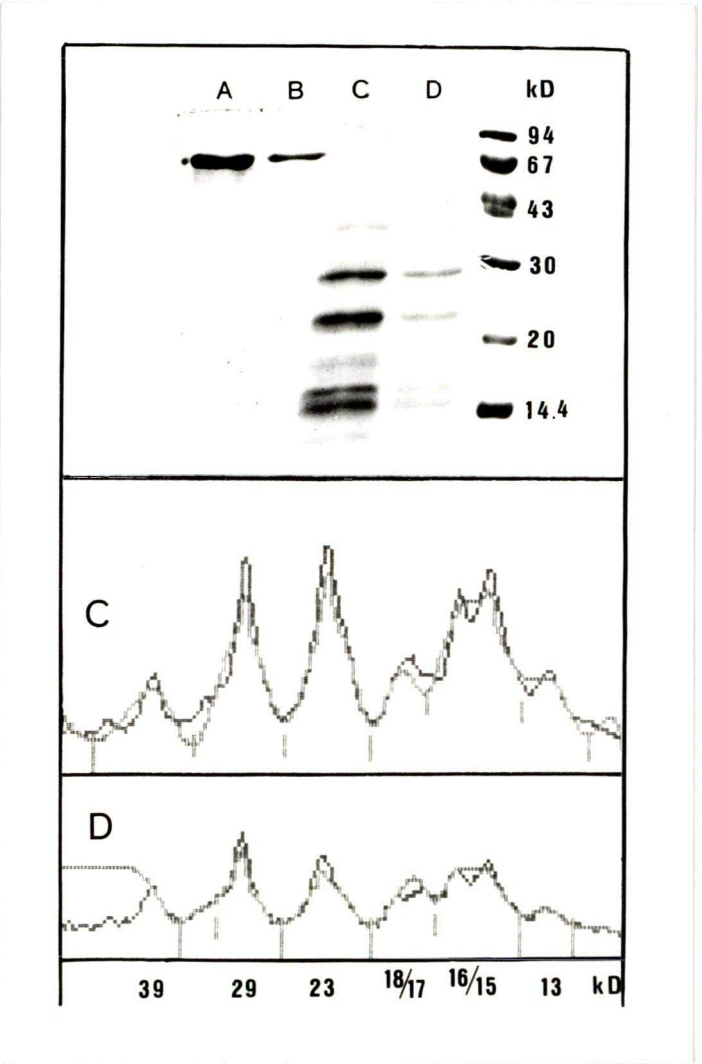
15. ábra
YHSA221-rekombináns élesztősejtek lizátumából tisztított rHSA immuno(Western)-blot-analízise

A: üveggyöngyös feltárással nyert sejtlizátumból tisztított rHSA
B: ismételt ultrahangos feltárással készített sejtlizátumból tisztított rHSA
C: kontroll (természetes) HSA



16. ábra
rHSA és rHBsAg immuno(Western)-blot-analízise

A: rHBsAg - anti-HBsAg reakció
B: rHSA - anti-HSA reakció
C: rHBsAg - anti-HSA keresztreakció
D: rHSA - anti-HBsAg keresztreakció
M: fehérje-mólsúlymarker



17. ábra
YHSA221-rekombináns sejtekből tisztított rHSA analízise

felső ábra:
A: kontroll (természetes) HSA SDS-poliakrilamidgél-elektroforézise
B: tisztított rHSA SDS-poliakrilamidgél-elektroforézise
C, D: az A és B minták cianogén bromid-hasítás utáni SDS-poliakrilamidgél-elektroforézise

alsó ábra:
C, D: a felső ábrán látható C és D minták lézerdenzitométeres vizsgálati eredménye

hasított fehérjék lézerdenzitométeres vizsgálata is azt mutatta, hogy a két fehérjeminta közötti különbségek csupán mennyiségi jellegűek.
A vizsgálatok elvégzésében Niemi Hannu (Biotechnika R.T.) és Soós József (SZBK, Biofizikai Intézet) voltak segítségemre.

2.5.4.A rekombináns HSA N-terminális szekvenciaanalízise

A Skandigen (Stockholm) által laboratóriumunkon kívül elvégzett N-terminális fehérjeszekvencia-analízis bizonyította, hogy az rHSA N-terminálisának aminosavszekvenciája azonos a vérből tisztított HSA megfelelő aminosavszekvenciájával.

A felsorakoztatott vizsgálati eredmények mindegyike a rekombináns sejtek lizátumaira ill. a belőlük tisztított fehérjékre vonatkozik. Ennek oka, hogy a rekombináns sejtek felülúszójából semmilyen módszerrel nem sikerült rHSA-t kimutatnunk. Tehát expressziós rendszerünk nem volt képes a rekombináns HSA-t a tápoldatba juttatni. Ezért szükségessé vált egy olyan konstrukció kialakítása, mely biztosította a HSA hatékonyabb expresszióját és a tápoldatba történő szekrécióját.

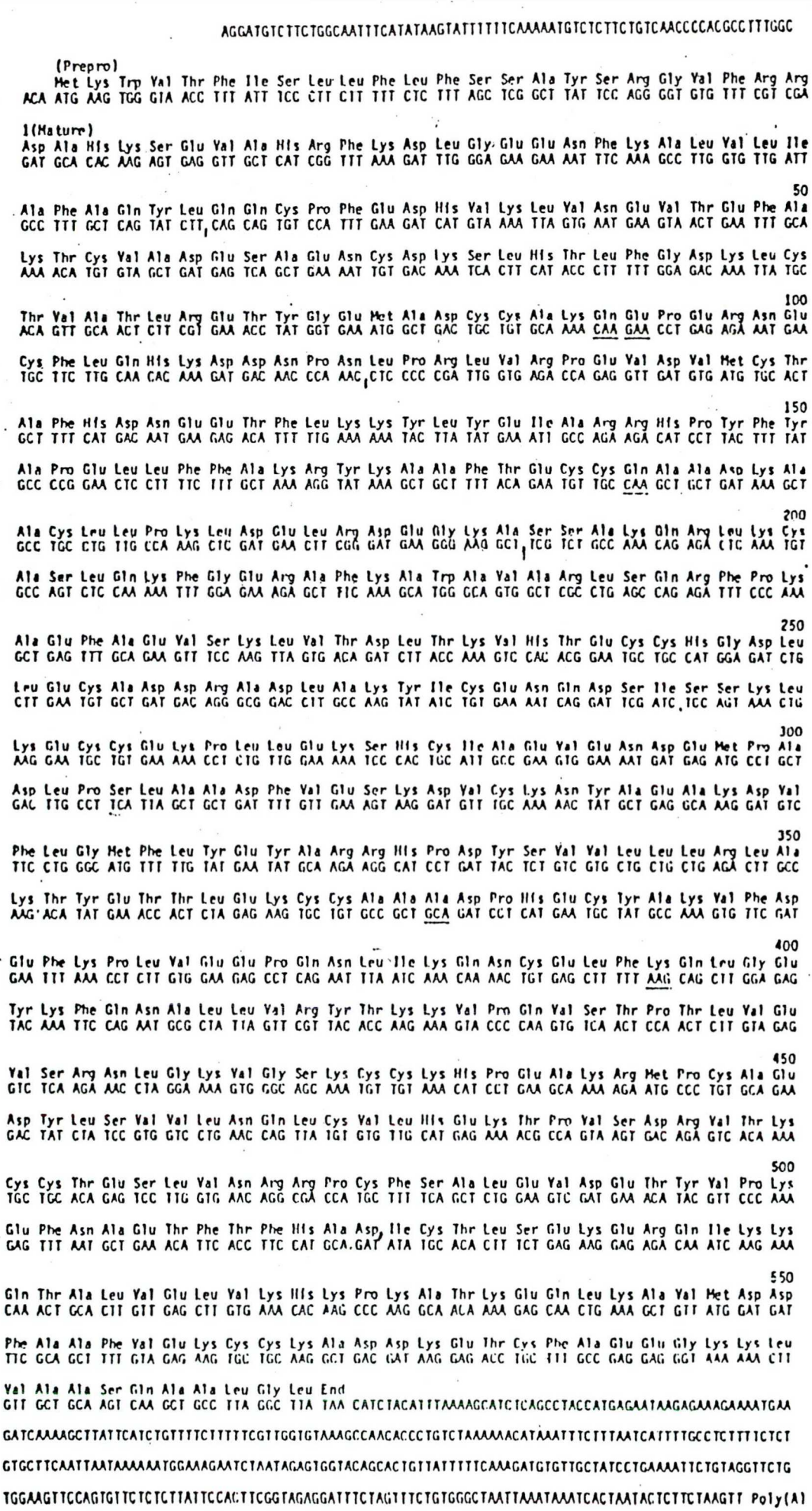
3. Hatékonyabb HSA-expressziós kazetta kialakítása, mely a *GAPDH*-promótert és a pre-pro-HSA-leader-szekvenciát is tartalmazza

3.1. A *GAPDH*-promóter klónozása

A *GAPDH*-promóter pUC8-vektorban - *Hind*III- és *Bam*HI-restrikciós hasítóhely között elhelyezkedve - állt rendelkezésünkre (Bitter és Egan, 1984). A *Hind*III-hasítóhely mellett a vektor tartalmazott egy *Pst*I-hasítóhelyet, melyet a további klónozási lépések érdekében eltávolítottunk (*Pst*I-hasítás, *Pol*I K-kezelés, ligálás). Az így módosított plazmid: pUC8*/GAPDH.
A promótert a későbbi klónozási lépések elvégzéséhez a pJRD184-vektorba (Heuterspreute és mtsi., 1987) is beépítettük, *Hind*III- és *Bam*HI-hasítóhely közé. Így kaptuk a pJRD184/GAPDH-plazmidot.

3.2. A szintetikus pre-pro-HSA-leader-szekvencia tervezése két változatban

A természetes pre-pro-HSA-ban a leader-peptid két utolsó aminosava: Arg-Arg (R-R; 18. ábra). A szintetikus génszakasz, mely a pre-pro-leadert kódolja, két



18. ábra

A természetes HSA cDNS-ének nukleotidszekvenciája és a humán szérumalbumin aminosavsorrendje (Lawn és mtsi., 1981)

változatban készült el: az egyik a természetes pre-pro-HSA-leadernek felel meg, míg a másik variációban a két utolsó aminosav Lys-Arg (K-R). Ez utóbbi változat kialakítását azért tartottuk érdekesnek, mert az élesztő KEX2-endopeptidáza e két aminosav után hasítja le a pre-pro-α-faktor leader-szekvenciáját. (Az α-faktor az élesztő 13 aminosavból álló párosodási feromonja [Kurjan és Herskowitz, 1982].) A leaderek szekvenciája a következő:

```
                                                  Met  Lys  Trp  Val  Thr  Phe
GATCAA  AAA  CAC TAA  AAT  ATAATCAAA ATG  AAG  TGG  GTT  ACT  TTC
     TT  TTT  GTG ATT  TTA  TA.......................................................
BamHI°-vég

Ile  Ser  Leu  Leu  Phe  Leu  Phe  Ser  Ser  Ala  Tyr  Ser  Arg
ATC  TCT  TTG  TTG  TTC  TTG  TTC  TCT  TCT  GCT  TAC  TCT  AGA
.......................................................................  AGA  TCT
                                                                        XbaI

Gly  Val  Phe                          Arg  Arg
GGT  GTT  TTC      RR-változat:        AGG  AGG
CCA  CAA  AAG                          TCC  TCC
                                                        Tompa vég

                                       Lys  Arg
                   KR-változat:        AAG  AGG CCT   G
                                       TTC  TCC GGA   CTT  AA
                                             StuI        EcoRI-vég
```

Az ATG-kodontól 5'-irányban elhelyezkedő 27 nukleotid hosszúságú szakasz a *GAPDH*-promóter hiányzó 3'-végét hivatott pótolni. Tervezésekor a legerősebb élesztőpromóterek nukleotidsorrendjét vettük figyelembe.
A pre-pro-HSA-t kódoló szekvenciában az aminosavsorrend azonos a természetessel, de a kodonhasználat az élesztőre jellemző (vö. 18. ábrával).
(A szintetikus pre-pro-HSA leader-szekvenciákat Rákhely Gábor [Biotechnika R.T.] állította elő kémiai DNS-szintézissel.)

3.3. A *GAPDH*-promóter és a szintetikus pre-pro-HSA-leader fúziója

A pUC8*/GAPDH-plazmidba építettük be a szintetikus leader KR-változatát. *Bam*HI- és *Eco*RI-hasítással a duplaszálú szintetikus szakasz számára megfelelő

ragadós végek keletkeztek. A ligálás a pGpreproKR-plazmidot (19. ábra) eredményezte, amelyben a *Bam*HI-hasítóhely nem alakult vissza.
Az RR-változatot a pJRD184/GAPDH-plazmidba illesztettük, *Bam*HI- és *Stu*I-hasítóhely közé, a pGpreproRR-plazmidot (19. ábra) kapva eredményül. (A *Bam*HI-hasítóhely itt sem alakult vissza.)

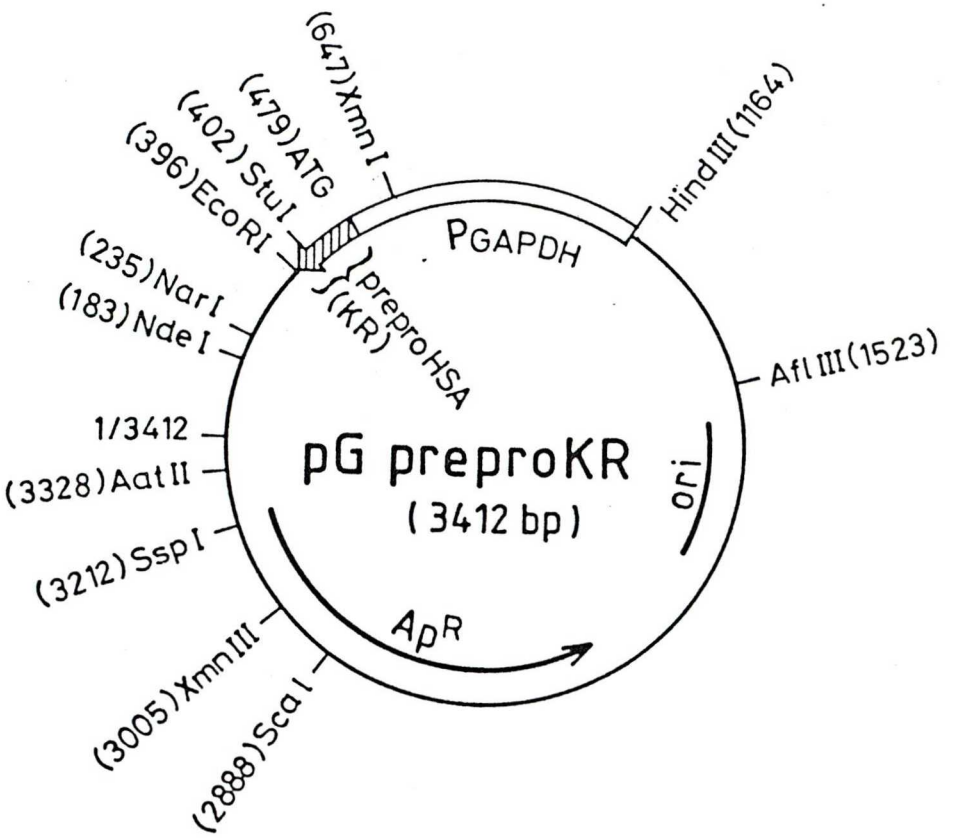
3.4. A HSA-expressziós kazetta teljes felépítése

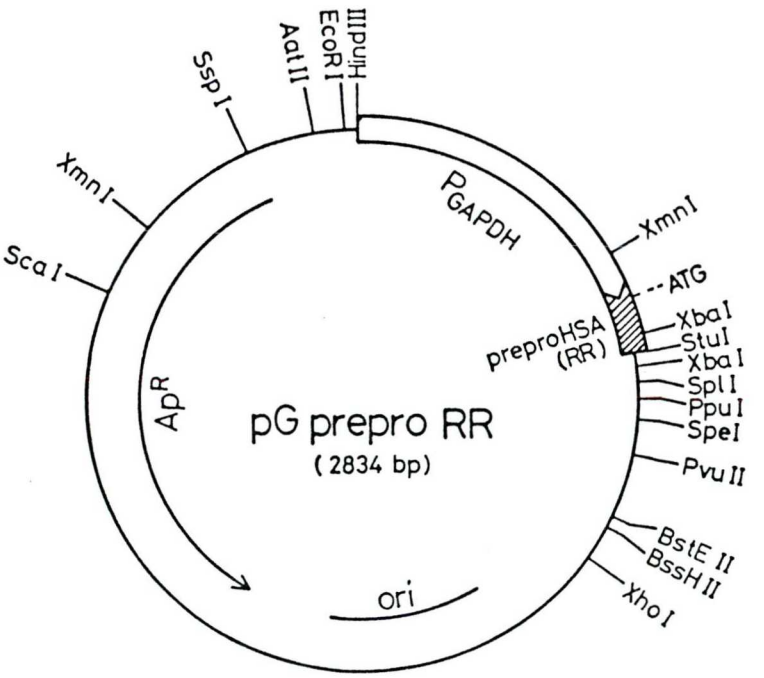
A pGB3-229TK°-plazmidba – *Pst*I-hasítóhelyének eltávolítása után - *Hind*III- és *Sac*I-hasítóhely közé beillesztettük a pUC19/HSA-ból *Hind*III- és *Sac*I-restrikciós enzimmel kivágott *HSA*-génszakaszt. Ennek eredménye a pHSA-T-plazmid (20. ábra).
A HSA-expressziós kazettát a KR-konstrukció esetében úgy tettük teljessé, hogy a *GAPDH*-promóter/szintetikus leader-szakaszt (melyet a pGpreproKR-ből *Hind*III- és *Stu*I-restrikciós endonukleázzal vágtunk ki) a pHSA-T-plazmidba, a *HSA*-gén elé helyeztük a *Hind*III- és *Pst*I(tompa)-hasítóhely közé. A későbbi klónozási lépések kivitelezéséhez a *Hind*III-hasítóhelyet *Bam*HI-hasítóhelyre cseréltük ki. Az így keletkezett plazmid: pGpreproHSA KR (21. ábra).
Az RR-változat esetében a pGpreproRR-plazmidba, a promóter/leader-fúzió mögé építettük be (a *Stu*I- és *Xho*I-hasítóhelyet felhasználva) a pHSA-T-ből - *Pst*I(tompa)- és *Xho*I-hasítással - származó *HSA*-gén/*HIS3*-terminátor-régiót. A *Hind*III-hasítóhely helyére itt is *Bam*HI-hasítóhely került. Az így kapott pGpreproHSA RR-plazmidban (21. ábra), csakúgy, mint a pGpreproHSA KR-ben is, az illeszkedéseket és a szintetikus leader nukleotidsorrendjét DNS-szekvenálással ellenőriztük.
A szintetikus pre-pro-HSA leader-szekvenciák nukleotidsorrendjét, valamint illeszkedésüket a *GAPDH*-promóter 3'-végéhez az M13-fág-klónozórendszer (Yanisch-Perron és mtsi., 1985) segítségével ellenőriztük.
A KR-változat szekvenciaanalízisekor kapott nukleotidsorrend:

TTCTACTTTT ATAGTTAGTC TTTTTTTTAG TTTTAAAACA CCAAGAACTT
AGTTTCGACG GATCAAAAAC ACTAAAATAT AATCAAAATG AAGTGGGTTA
CTTTCATCTC TTTGTTGTTC TTGTTCTCTT CTGCTTACTC TAGAGGTGTT
TTCAAGAGGC CCT

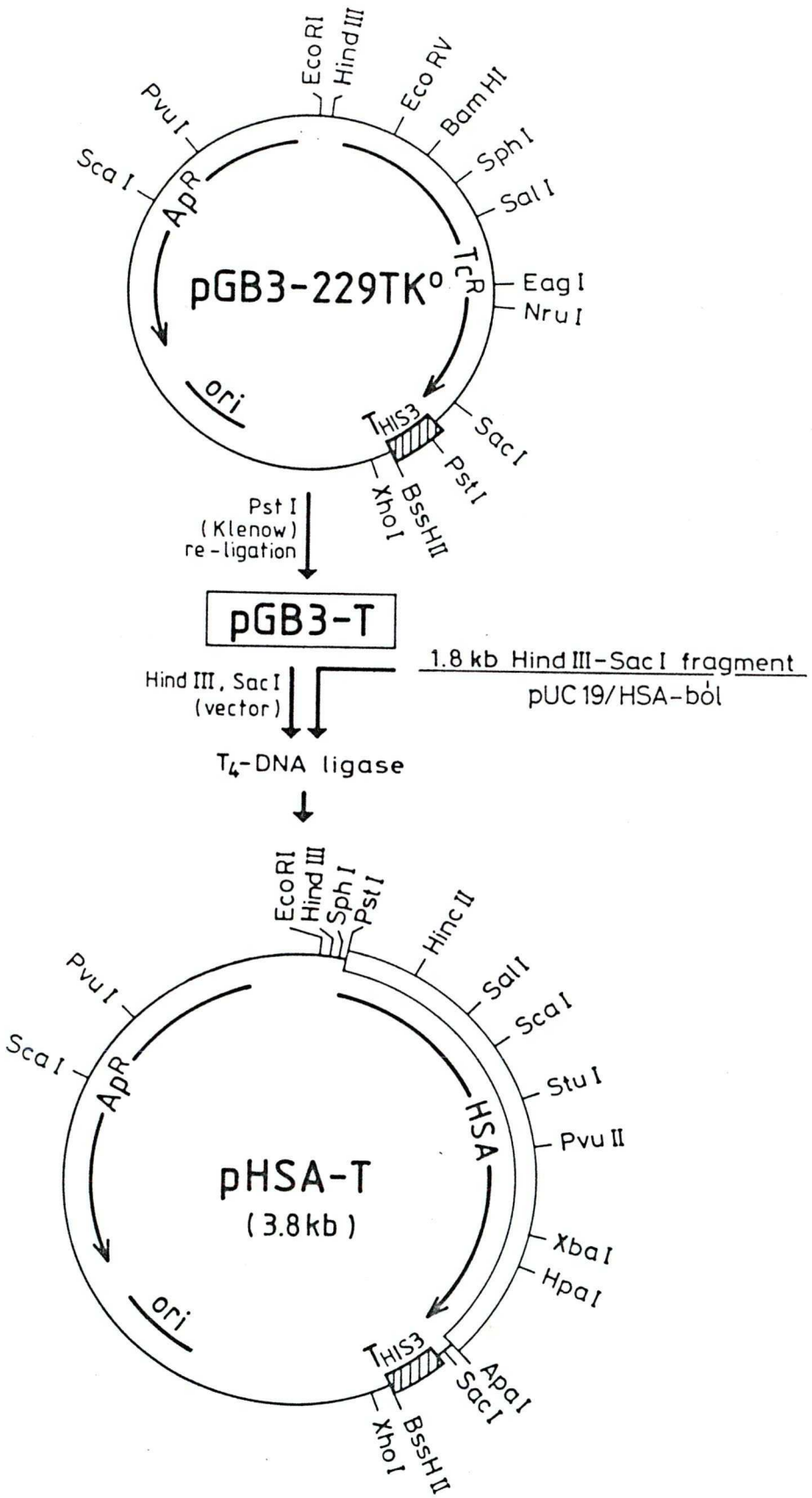
Az RR-változatban kapott nukleotidsorrend:

TTCTACTTTT ATAGTTAGTC TTTTTTTTAG TTTTAAAACA CCAAGAACTT
AGTTTCGACG GATCAAAAAC ACTAAAATAT AATCAAAATG AAGTGGGTTA
CTTTCATCTC TTTGTTGTTC TTGTTCTCTT CTGCTTACTC T

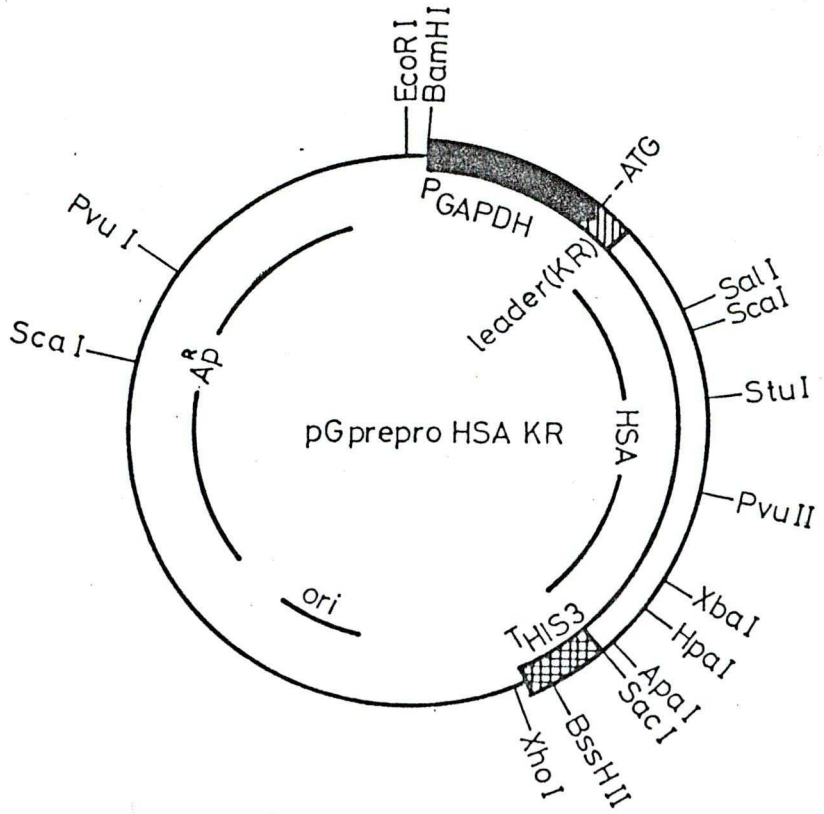


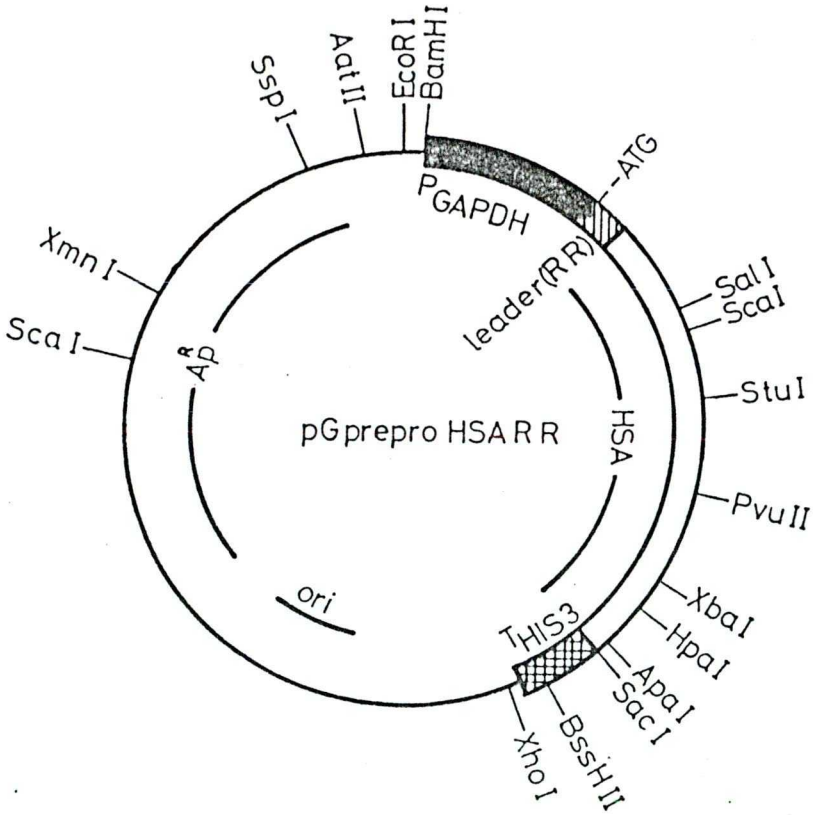


19. ábra
A *GAPDH*-promótert és a szintetikus pre-pro-HSA-leader-szekvenciát tartalmazó plazmidok térképe



20. ábra
A szintetikus *HSA*-gén és a *HIS3*-gén transzkripciós terminátor-génszakaszának összeillesztése





21. ábra
A teljes HSA-expressziós kazettát hordozó plazmidok térképe

A leolvasott szekvenciákban azonosítottuk a hiányos *GAPDH*-promóter (Bitter és Egan, 1984) 3'-végét és az azt követő szintetikus leader-szekvenciák megfelelő nukleotidsorrendjét (vö. a 3.2. pont szekvenciaadataival).
A szintetikus HSA-primer segítségével ellenőriztük az expressziós kazettákban a *GAPDH*-promóter, a szintetikus pre-pro-HSA leader-szekvenciák és a szintetikus *HSA*-gén illeszkedését:

KR-változat:

TTCTACTTTT ATAGTTAGTC TTTTTTTTAG TTTTAAAACA CCAAGAACTT
AGTTTCGACG GATCAAAAAC ACTAAAATAT AATCAAAATG AAGTGGGTTA
CTTTCATCTC TTTGTTGTTC TTGTTCTCTT CTGCTTACTC TAGAGGTGTT
TTCAAGAGGG ACGCTCACA

RR-változat:

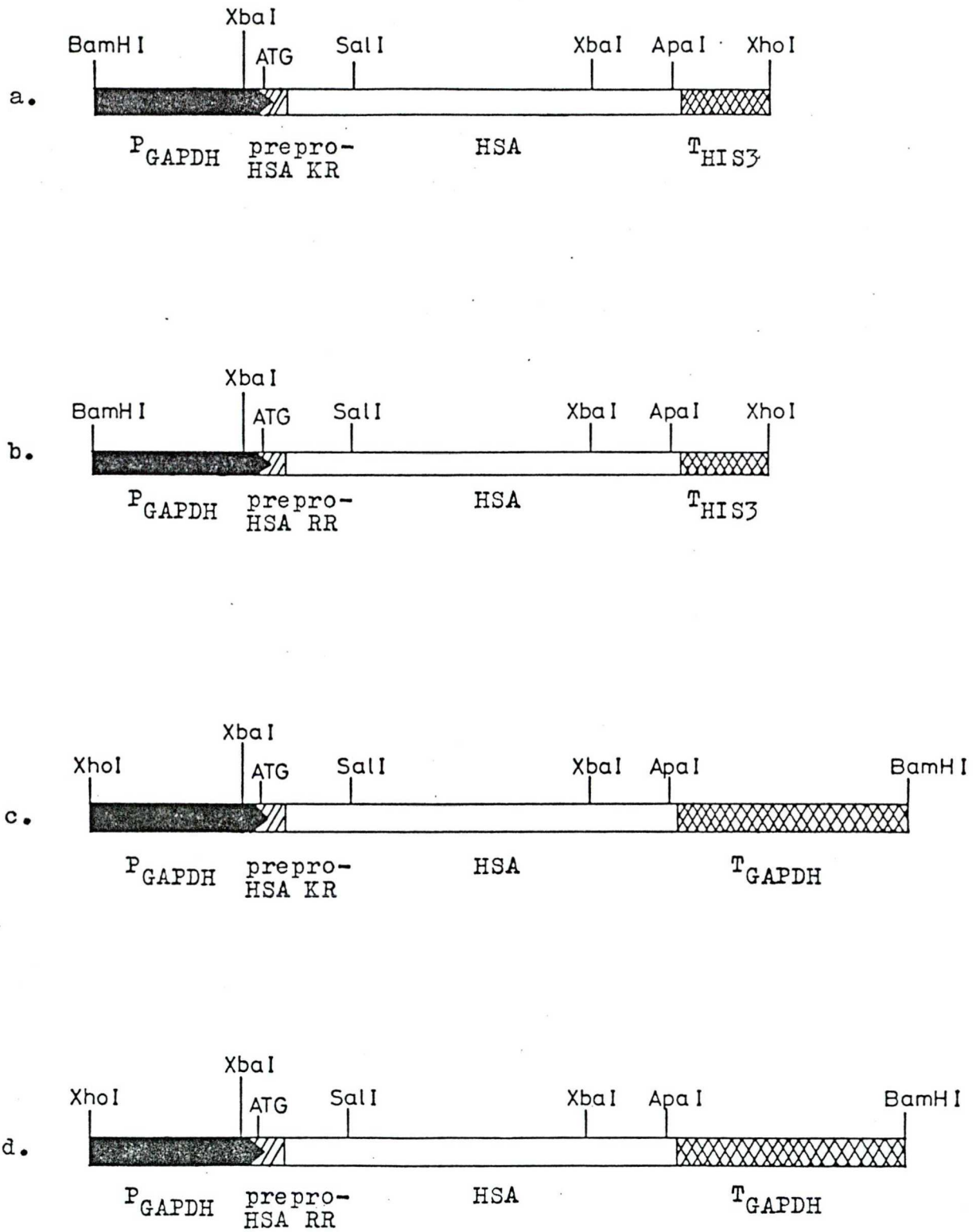
TTCTACTTTT ATAGTTAGTC TTTTTTTTAG TTTTAAAACA CCAAGAACTT
AGTTTCGACG GATCAAAAAC ACTAAAATAT AATCAAAATG AAGTGGGTTA
CTTTCATCTC TTTGTTGTTC TTGTTCTCTT CTGCTTACTC TAGAGGTGTT
TTCAGGAGGG ACGCTCACA

A nukleotidsorrend mindkét kazetta esetében megegyezett a tervezett nukleotidszekvenciával (vö. a 3.2. pont szekvenciaadataival).

A fenti HSA-expressziós plazmidokkal párhuzamosan Lukácsovits Tamás és Boros Imre közreműködésével (SZBK Biokémiai Intézet) mind a KR-, mind az RR-konstrukció esetében olyan változat is készült, melyben a *HIS3*-terminátor helyett a *GAPDH*-gén terminátor régiója szerepel. A konstrukciók többi részlete megegyezik a fenti, ábrákkal is illusztrált plazmidokkal, azzal a megszorítással, hogy a további építkezéshez a *GAPDH*-promóter elejére *Xho*I-hasítóhelyet kellett beépíteni, a *GAPDH*-terminátor végén ugyanis *Bam*HI-hasítóhely van.

3.5. HSA-t expresszáló ingázóplazmidok kialakítása

A *GAPDH*-promótert és a pre-pro-HSA-leader-t tartalmazó expressziós kazetta négy változatban készült el (22. ábra):



22. ábra
A *GAPDH*-promótert és a szintetikus pre-pro-HSA-leader-szekvenciákat tartalmazó HSA-expressziós kazetták

"a":	*GAPDH*-promóter	pre-pro-HSA-leader-KR	*HSA*-gén	*HIS3*-teminátor
"b":	*GAPDH*-promóter	pre-pro-HSA-leader-RR	*HSA*-gén	*HIS3*-terminátor
"c":	*GAPDH*-promóter	pre-pro-HSA-leader-KR	*HSA*-gén	*GAPDH*-terminátor
"d":	*GAPDH*-promóter	pre-pro-HSA-leader-RR	*HSA*-gén	*GAPDH*-terminátor

A kazettákat kétféle ingázóvektorba illesztettük be (23. ábra). A két vektor alapvető különbsége, hogy míg az Yp88 az élesztő 2μm-es plazmidjából csak a replikációs origót, addig az YRp2B a teljes 2μm-es plazmidot (annak B formáját) tartalmazza. Ez az YRp2B-plazmidot - a kazetta behelyezése után is - alkalmassá teszi arra, hogy cir°-élesztőtörzsekbe transzformáljuk, melyek maguk nem tartalmaznak 2μm-es plazmidot. Így az expressziós plazmidnak nincs "versenytársa" és a plazmidok közötti intracelluláris rekombináció kizárt.
A kazettákat a következő variációkban építettük be a vektorokba (24. ábra):

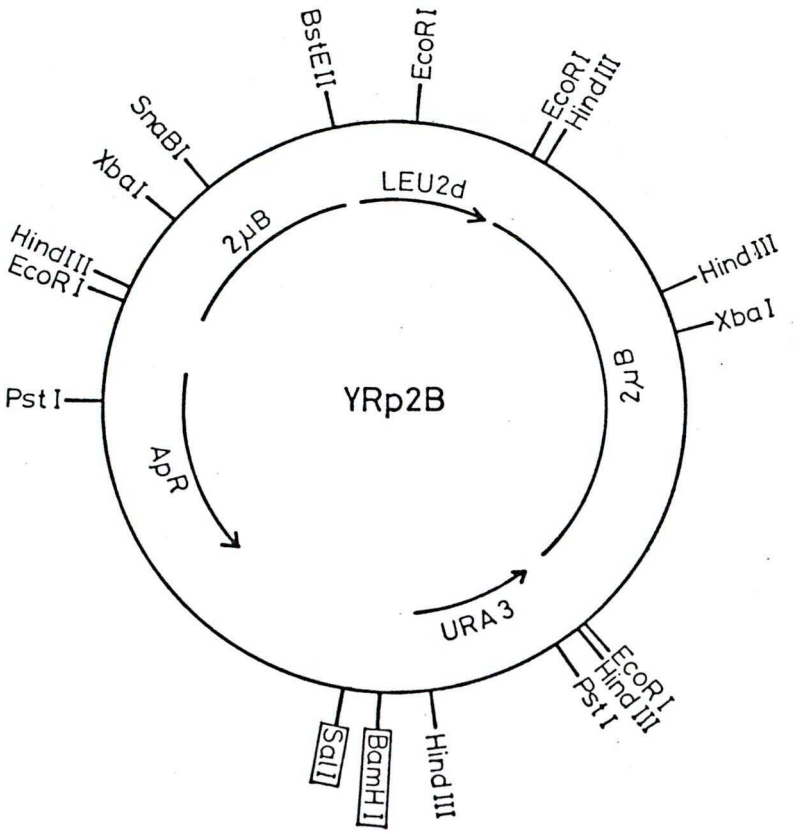
YRp2B (*Bam*HI - *Sal*I) + "b" kazetta (pre-pro-HSA-RR; *HIS3*-terminátor) =
= **YRp2B/PGppRRHSA-HIS$_T$**

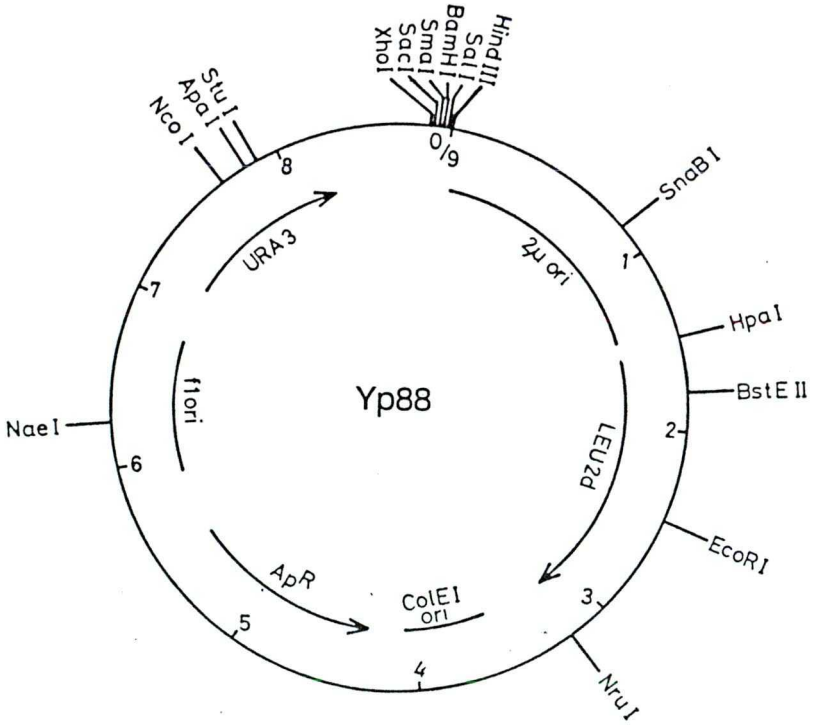
+ "c" kazetta (pre-pro-HSA-KR; *GAPDH*-terminátor) =
= **YRp2B/PGppKRHSA-GAP$_T$**

+ "d" kazetta (pre-pro-HSA-RR; *GAPDH*-terminátor) =
= **YRp2B/PGppRRHSA-GAP$_T$**

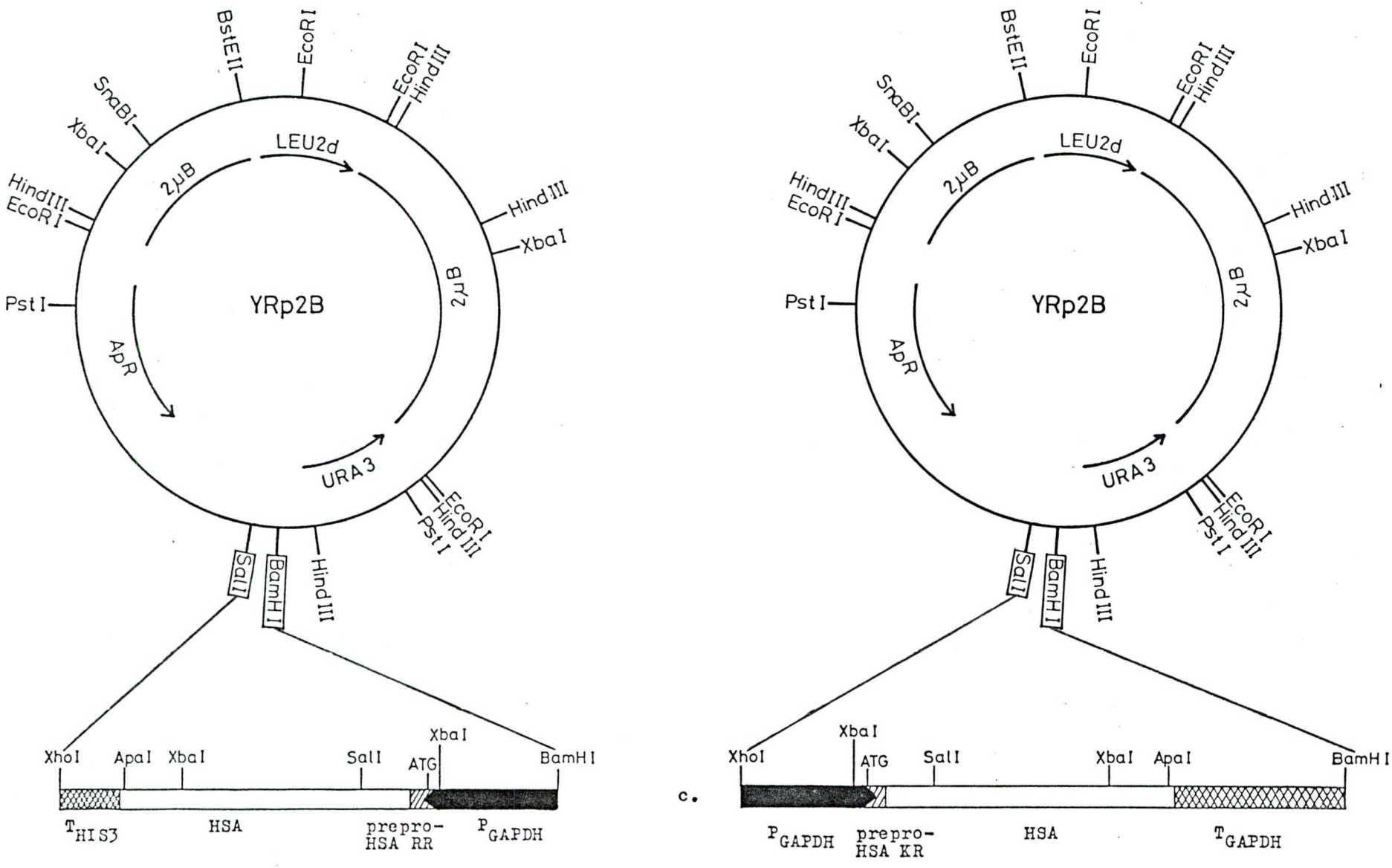
Yp88 (*Bam*HI – *Xho*I) + "c" kazetta (pre-pro-HSA-KR; *GAPDH*-terminátor) =
= **Yp88/PGppKRHSA-GAP$_T$**

Az expressziós kazettákat minden esetben *Bam*HI- és *Xho*I-restrikciós enzimmel vágtuk ki.
(Az "a"-kazettát nem építettük be ingázóvektorba.)



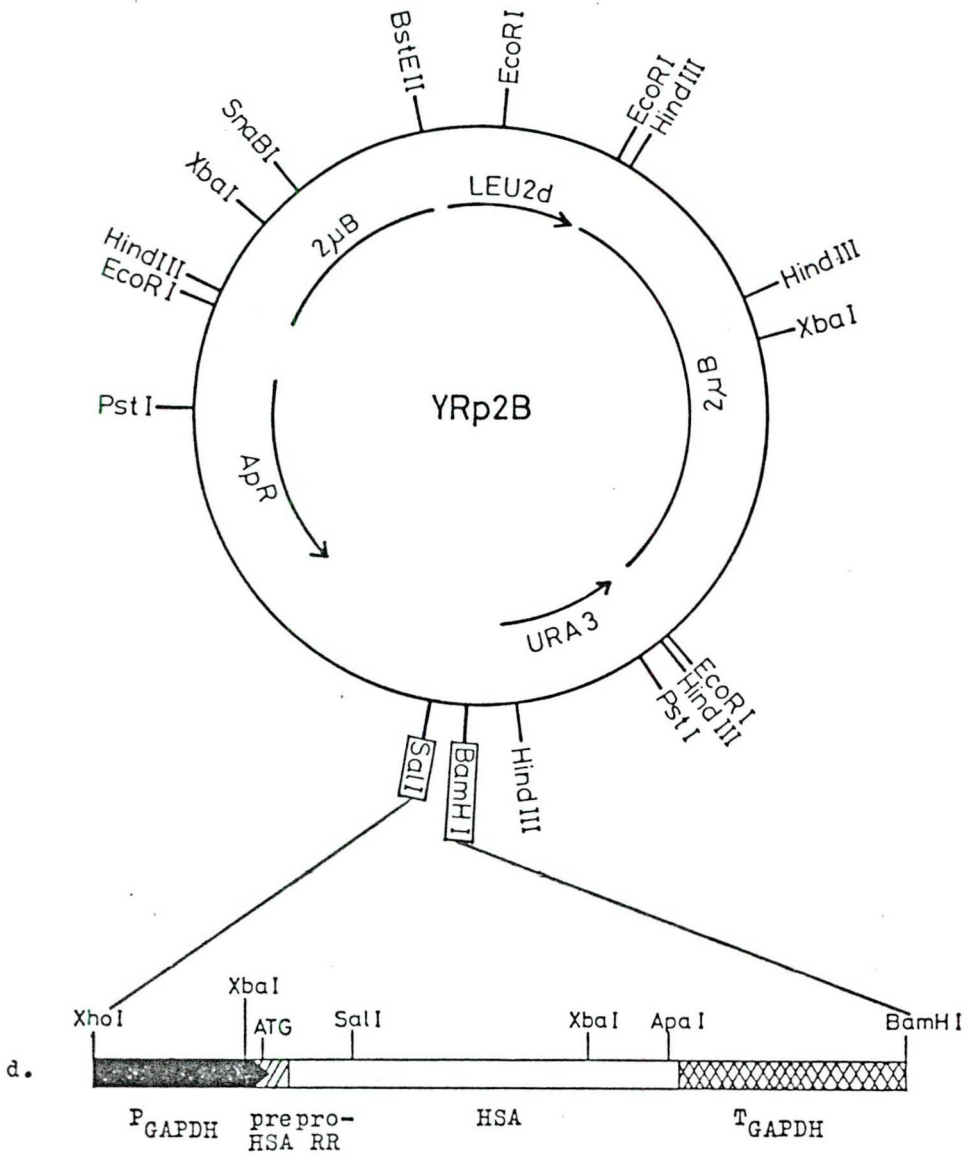


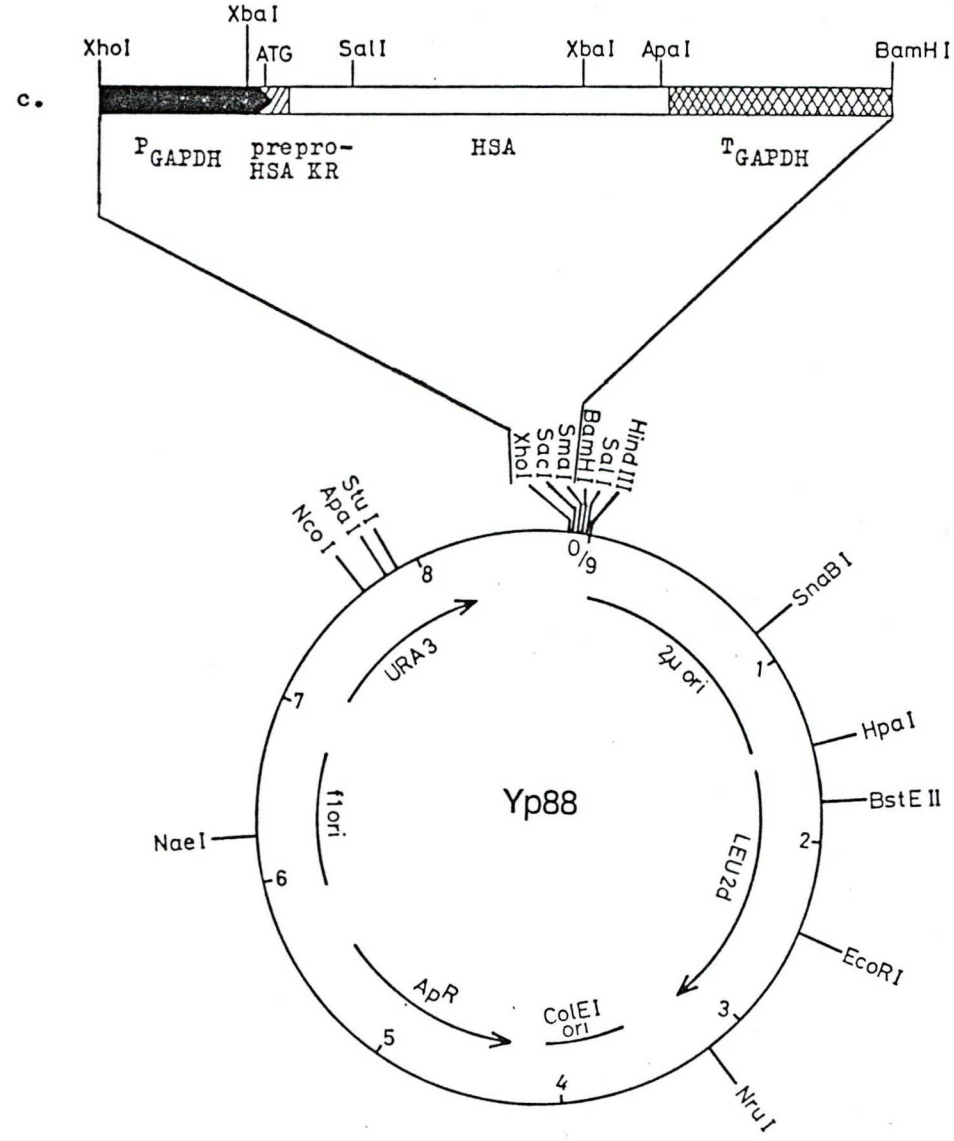
23. ábra
A HSA-expressziós kazetták befogadására alkalmazott ingázóvektorok



24. ábra

A *GAPDH*-promótert és a szintetikus pre-pro-HSA-leader-szekvenciákat tartalmazó HSA-expressziós kazetták beépítése ingázóvektorokba





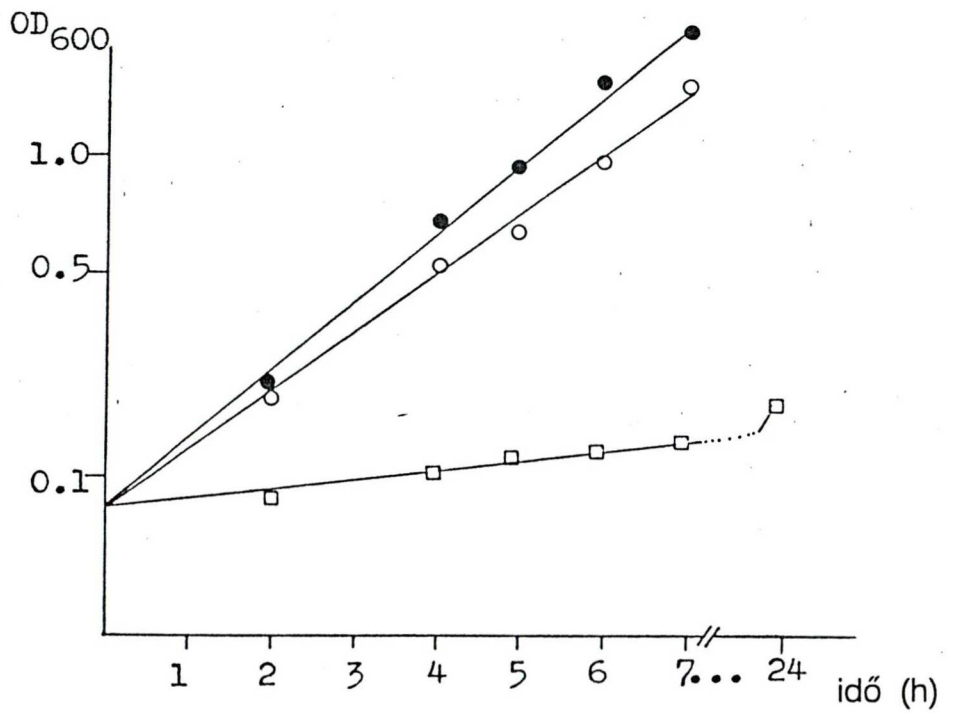
24. ábra folytatása

4. A *GAPDH*-promótert és a pre-pro-HSA-leadert tartalmazó expressziós vektorokkal transzformált rekombináns élesztők vizsgálata

4.1. Élesztőtranszformálások: HSA-termelő törzsek létrehozása

Az expressziós vektorok bevitelét először *Saccharomyces cerevisiae* élesztő LL20-törzsébe kíséreltük meg, leucinszelekciót alkalmazva.
A 25. ábra rekombináns élesztősejtek szelektív YNB-tápoldatban megfigyelhető szaporodását mutatja be egy *PHO5*-promótert (**pYHSA-2**) és egy *GAPDH*-promótert tartalmazó konstukció (**Yp88/PGppKRHSA-GAP$_T$**) esetében. A *GAPDH*-promóter által biztosított erős konstitutív expresszió mellett a rekombináns sejtek alig nőttek. A sejtszuszpenzió fénymikroszkópos vizsgálatakor nagyarányú sejthalálozást figyeltünk meg. Egyáltalán nem nőttek ki sejtkolóniák, amikor a szuszpenziót szelektív táptalaj felületére szélesztettük. A plazmidokat a jól transzformálható, jól szaporodó, életképes DBY746-törzsbe transzformálva is azonos eredményeket kaptunk.
Üres (expressziós kazettát nem tartalmazó) vektorokkal transzformált élesztősejtek minden esetben egészségesen szaporodtak.
A fenti eredményekből arra következtettünk, hogy erős konstitutív promóter esetében nem alkalmazható a leucinszelekció. Ezért áttértünk az uracilszelekcióra, mellyel - mint azt az alábbiakban látni fogjuk - sokkal bíztatóbb eredményeket kaptunk. (A kísérletek kivitelezésében Glatz Attila [Biotechnika R.T.] volt segítségemre.
Azokat a HSA-expressziós vektorokat, melyek a teljes 2μm-es plazmidot tartalmazzák az YNG452-törzsbe (cir°), míg a 2μm-es plazmidnak csak az ori-ját hordozót a DBY746-törzsbe (cir$^+$) transzformáltuk. A **YRp2B/PGppKRHSA-GAPT**-plazmidot az YNG452-törzs mellett a DBY746-törzsbe is betranszformáltuk.
A továbbiakban minden esetben uracilszelekciót alkalmaztunk.
Összefoglalva, a következő transzformálásokat hajtottuk végre:

DBY746	+	**Yp88/PGppKRHSA-GAP$_T$**	(1)
		YRp2B/PGppKRHSA-GAP$_T$	(2)
YNG452	+	**YRp2B/PGppKRHSA-GAP$_T$**	(3)
		YRp2B/PGppRRHSA-GAP$_T$	(4)
		YRP2B/PGppRRHSA-HIS$_T$	(5)



25. ábra
Konstitutív és represszálható HSA-expressziós vektorokkal transzformált LL20-élesztősejtek növekedése leucin-szelekció alkalmazásakor

—○— : **pYHSA-2**-vel transzformált rekombináns sejtek szaporodása (nagy Pi-koncentrációjú szelektív tápoldatban)

—□— : **Yp88/pGppKRHSA-GAPT**-vel (erős konstitutív promóter) tanszformált rekombináns sejtek szaporodása

—●— : **pJDB207**-tel ("üres" vektor) transzformált rekombináns sejtek szaporodása

4.2. HSA-expresszió vizsgálata sejtfelülúszókban

Rázatott folyadéktenyészetekben - a sejtek felülúszójában - vizsgáltuk a szekretált rekombináns HSA mennyiségét. Félkvantitatív ELISA-teszttel a következő expressziós szinteket mértük a legjobban termelő izolátumokban (expressziós szinten azt a szekretált fehérjemennyiséget értjük, mely az adott génről szintetizálódik, és autentikus fehérjekimutatási módszerrel - esetünkben félkvantitatív ELISA-teszttel - meghatározható):

	mg/l HSA
(1):	1,2
(2):	1,0
(3):	4,2
(4):	2,2
(5):	5.9

Meg kell jegyeznünk, hogy az eredmények elég nagy szórást mutattak az egyes izolátumok között.
Ugyanazt az expressziós vektort (**YRp2B/PGppKRHSA-GAP$_T$**) a DBY746(cir$^+$)-törzsbe, ill. az YNG452(cir°)-törzsbe transzformálva, az utóbbi esetben jóval magasabb HSA-expressziós szintet mértünk [vö. (2) és (3)].
Egy további vizsgálat is alátámasztotta ezt a megfigyelésünket. A (2) és (3) rekombináns törzseket párhuzamosan tenyésztettük laboratóriumi fermentorban, azonos körülmények között. A fermentáció során a következő expressziós szinteket mértük:

Tanszformált törzs	OD_{600}	HSA termelés (mg/l)
DBY746 (2)	75	20
YNG452 (3)	75	35

Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a cir°-törzs alkalmasabb gazda az expressziós vektorok számára.

4.3. A szekretált HSA molekuláris analízise

4.3.1. SDS-poliakrilamidgél-elektroforézis

Az Yp88/PGppKRHSA-GAPT-plazmiddal transzformált DBY746-rekombináns élesztősejtek sejtfelülúszóját, természetes HSA-val párhuzamosan (kontroll),

immunaffinitás-kromatográfiával tisztítottuk. A tisztított fehérjéket SDS-poliakrilamidgél-elektroforézissel mólsúly szerint elválasztva kaptuk a 26. ábrán bemutatott képet. Megállapítottuk, hogy a rekombináns élesztősejtek a természetes HSA-val azonos mólsúlyú fehérjét szekretáltak, mely immunológiai szempontból is azonos módon viselkedett a természetes HSA-val.

4.3.2. Immuno(Western)-blot-analízis

Az **Yp88/PGppKRHSA-GAPT**-plazmiddal transzformált DBY746-rekombináns élesztősejtek sejtfelülúszóiból és sejtlizátumaiból tisztított fehérjéket Western-blot-analízisnek is alávetettük. A kapott eredményt a 27. ábra szemlélteti. Valamennyi mintában megjelent az anti-HSA-szérummal reagáló 67 kD-os fehérje, a kontroll HSA-nak megfelelő helyen.
Ugyanakkor fellelhetők egyenlőre azonosítatlan fehérjecsíkok is. Így az anti-HSA-szérummal a felülúszók mindegyikében reagált egy 47 kD-os, míg a sejtlizátumokban egy 30 kD-os fehérje. E fehérjék természetéről csak feltételezéseink vannak (Lásd "Eredmények megvitatása").

4.4. Laboratóriumi szintű fermentáció

4.4.1. A HSA-expresszió vizsgálata

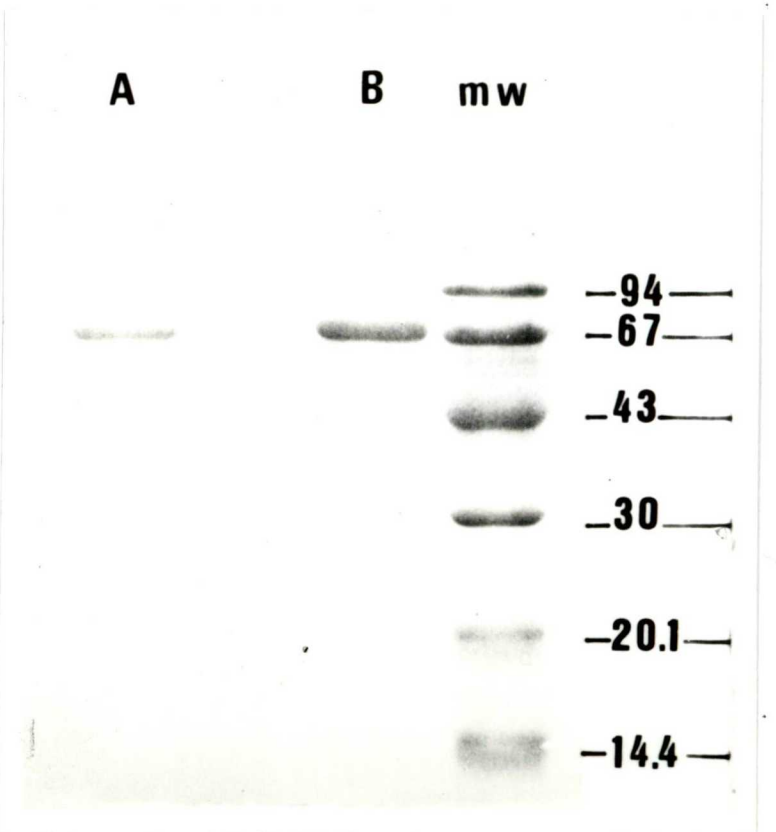
A fermentációs kísérletekben a rázatott folyadéktenyészetekben leghatékonyabban termelő izolátumok vettek részt. A sejtek felülúszójában mértük a szekretált HSA mennyiségét. Az elért legmagasab HSA-expressziós szintek a következők voltak:

YNG452 +	**YRp2B/PGppKRHSA-GAP$_T$** (3)	120 mg/l	HSA
	YRp2B/PGppRRHSA-GAP$_T$ (4)	110 mg/l	HSA
	YRp2B/PGppRRHSA-HIS$_T$ (5)	105 mg/l	HSA

A laboratóriumi szintű fermentációs kísérleteket részben laboratóriumunkban hajtottuk végre Vasi József segítségével, részben pedig a Skandigen (Stockholm) által megbízott külföldi laboratóriumokban végezték el.

4.4.2. A plazmidstabilitás vizsgálata

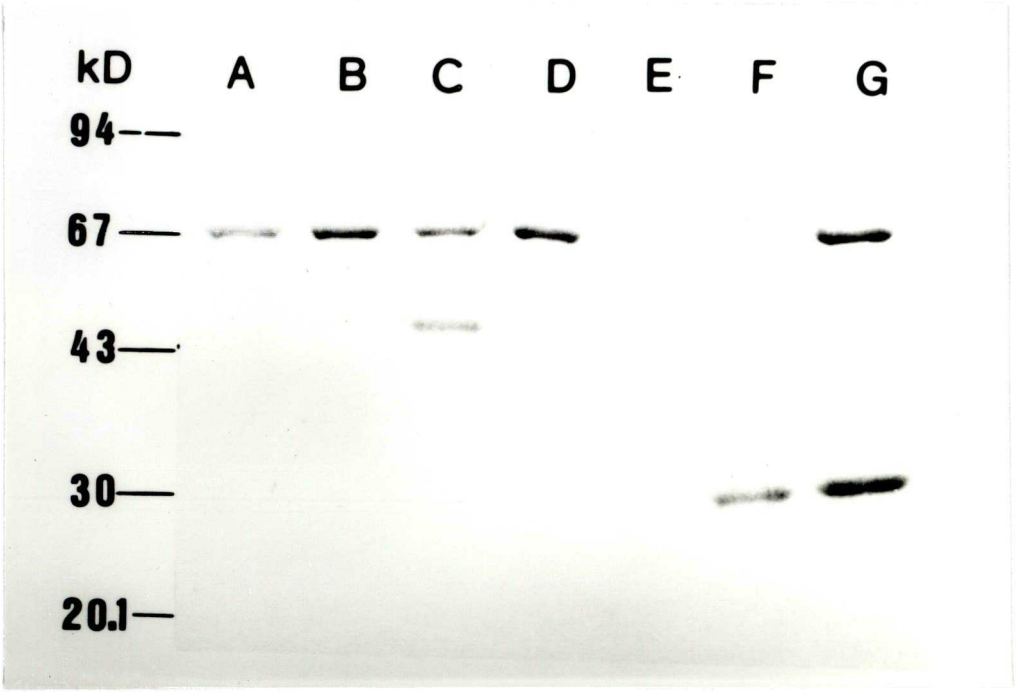
A 28. ábra bemutatja a HSA-expressziós szint, a sejtdenzitás és a plazmidstabilitás alakulását egy fermentáció során, 100 órán keresztül folytatott megfigyelés alapján. A kísérletben a fentebb felsorolt, leghatékonyabban termelő



26. ábra
Immunaffinitás-kromatográfiával tisztított fehérjék SDS-poliakrilamidgél-elektroforézise

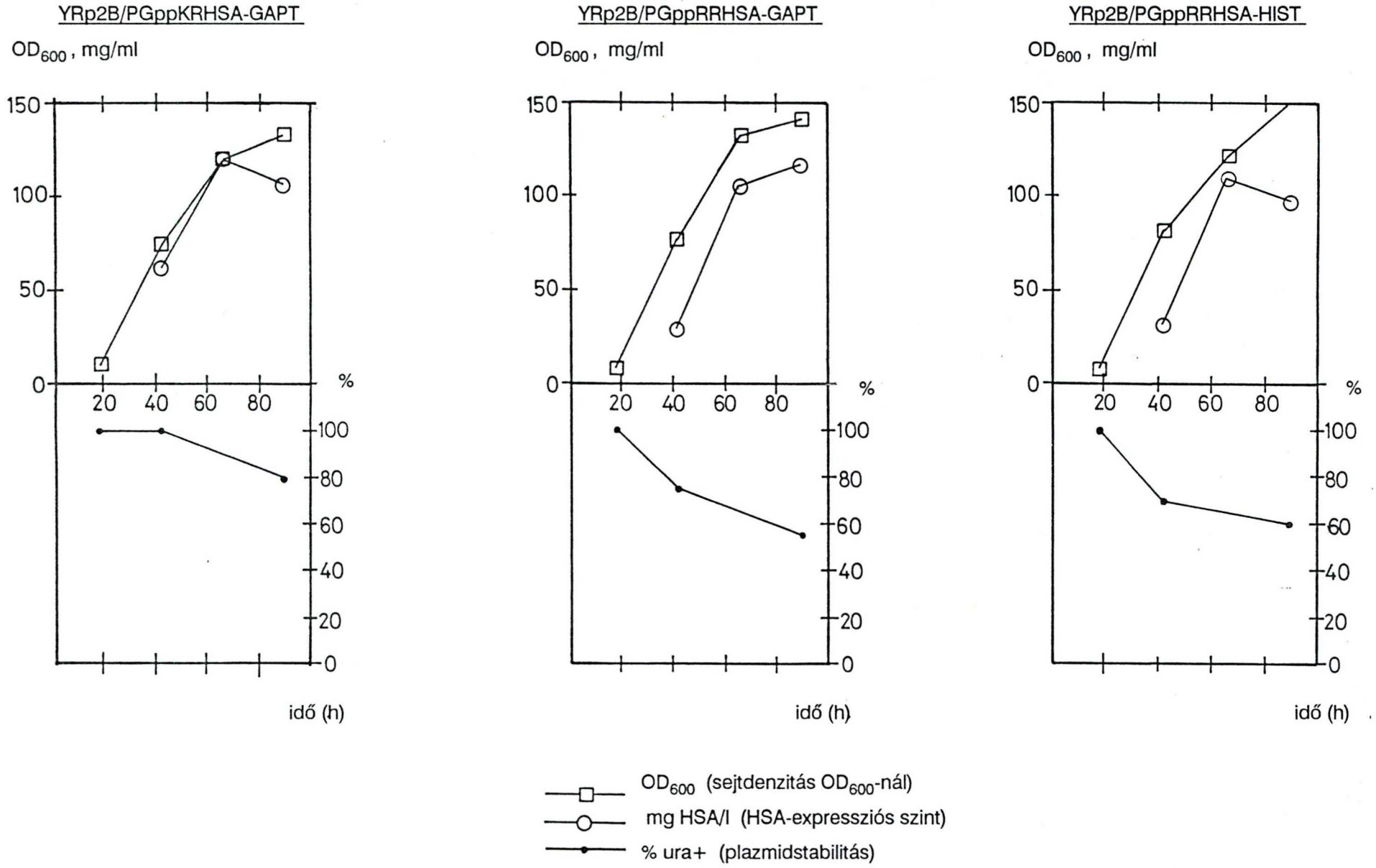
A: kontroll (természetes) HSA
B: az **Yp88/PGppKRHSA-GAPT**-HSA-expressziós vektorral transzformált DBY746-rekombináns élesztősejtek felülúszójából tisztított fehérje

mw: fehérje-mólsúlymarker



27. ábra
Az **Yp88/PGppKRHSA-GAPT**-plazmiddal transzformált DBY746-rekombináns élesztősejtek felülúszójának és sejtlizátumának immuno(Western)-blot analízise

A: kontroll (természetes) HSA
B-E: a tápfolyadékba szekretált, anti-HSA-szérummal reagáló fehérjék
F-G: a termelő sejtek lizátumából származó, anti-HSA-szérummal reagáló fehérjék



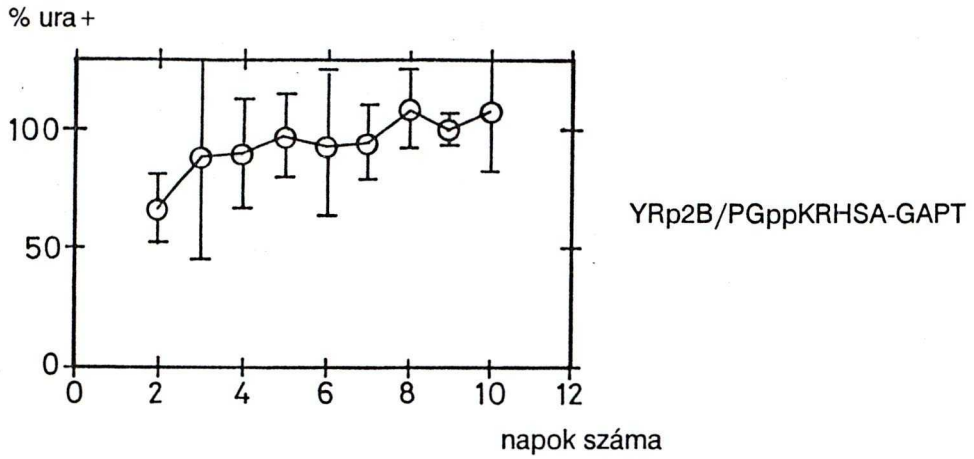
28. ábra

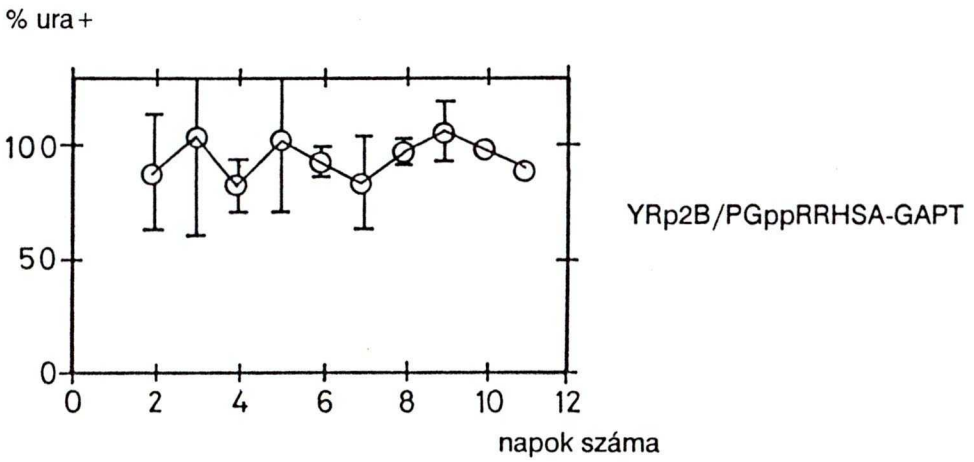
A sejtdenzitás, a HSA-expresszió és a plazmidstabilitás alakulása 100 órás fermentáció során a leghatékonyabban termelő YNG452-rekombináns sejtvonalak esetében

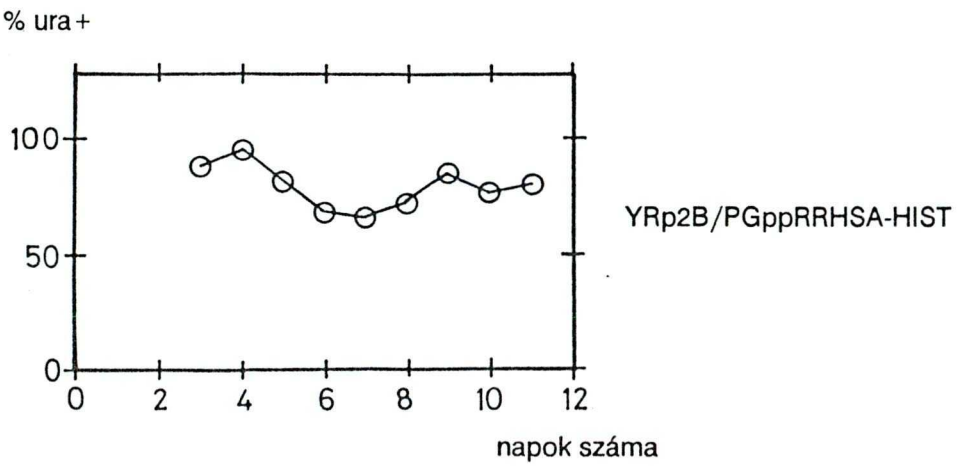
izolátumok vettek részt. A sejtdenzitás növekedésével nagyjából párhuzamosan növekedett a szekretált HSA mennyisége, míg a plazmidstabilitás folyamatos csökkenést mutatott.
A 29. ábra egy 11 napig tartó fermentálási kísérletben kapott plazmidstabilitási eredményeket mutat be (az előző kísérletben is szereplő izolátumok esetében). Úgy tűnt, hogy a több napig tartó fermentálás során kialakult egy olyan egyensúlyi állapot, melyben a plazmidstabilitás értéke 80% körül ingadozott.

A fermentációs kísérletek tájékozódó jellegűek voltak, hiszen ez a szakterület nem tartozott laboratóriumunk irányvonalához.

A laboratóriumi szintű fermentációs kísérletek alapján a következőket állapítottuk meg:
- a prepro-HSA-RR- és -KR-konstrukciók között nincs szignifikáns különbség
- a *GAPDH*- és a *HIS3*-terminátort tartalmazó HSA-expressziós vektorok között szintén nem állapítható meg alapvető eltérés
- a plazmidstabilitás a fementáció során elfogadható szintű (60-70 generáció után >80%).







29. ábra
A plazmidstabilitás vizsgálata 11 napos fermentáció során a leghatékonyabban termelő YNG452-rekombináns sejtvonalak esetében

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő alkalmas a humán szérumalbumin expressziójára és szekréciójára, mégpedig oly módon, hogy a termelt rekombináns fehérje tökéletesen azonos az emberi szervezetben szintetizálódó fehérjével.

A szintetikus *HSA*-gén

A szakirodalomban már megjelentek olyan közlemények, melyek a humán szérumalbumin mikroorganizmusokban megvalósított sikeres expressziójáról számoltak be (Etchverry és mtsi., 1986; Latta és mtsi., 1987; Lawn és mtsi., 1981; Saunders és mtsi., 1987). E kísérletek mindegyikében HSA-cDNS-klónokat használtak fel.

Ugyanakkor a rekombináns DNS-technikákon alapuló kutatási és fejlesztési munkák végzése során újszerű gondolkodásmódot alakított ki az a lehetőség, amelyet a kémiai DNS-szintézis rutinszerű napi alkalmazása nyújt. A struktúrgéneket tetszés szerint lehet módosítani, de ha a kísérleti feltételek úgy kívánják, a struktúrgének expresszióját vagy a géntermék szekrécióját szabályozó génszakaszokat is tervezni lehet. Ezen lehetőségeket igyekeztünk kihasználni kísérleteink során, melyek célja a HSA termelésére alkalmas élesztő expressziós plazmidvektorok konstrukciója és rekombináns élesztőtörzsek létrehozása volt.

A szintetikus *HSA*-gén tervezésekor Simoncsits András és mtsi. a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő erőteljesen expresszált génjeiben leggyakrabban előforduló kodonokat vették figyelembe legfontosabb szempontként (Kálmán és mtsi., 1990; Bennetzen és Hall, 1982). A gén tervezése (1985) óta napvilágot látott közlemények azt sugallják, hogy a gazdasejt számára optimális kodonhasználat nem döntő tényező az idegen gének expressziójában (Ohno, 1988).

Ma már úgy véljük, hogy a gén tervezésekor célszerű lett volna az elsődleges géntermék, az mRNS-lánc struktúráját is figyelembe venni (Ernst, 1988.). Elkerülendő, pl., hogy a transzlációs iniciációs kodon (AUG) zárt kettőssláncú struktúrában legyen, valamint, hogy potenciális riboszómakötő-helyek forduljanak elő rajta. Az mRNS struktúrája, mivel a transzlációt befolyásolja, fontos tényezője lehet a fehérjetermék struktúrája kialakulásának is.

Ma már közismert, hogy a fehérjék szintézisük során a teljes polipeptidlánc elkészülése előtt, még a riboszómákhoz kapcsolódva elkezdik végleges térbeli konformációjuk kialakítását. Purvis és mtsi. elmélete szerint - melynek néhány kísérleti alátámasztása is létezik - a transzláció során a naszcens polipeptidlánc elongációját bizonyos ritka kodonok befolyásolhatják (Purvis és mtsi., 1987). Úgy képzelik, hogy a ritka kodonok - a funkcionális domain-határokon elhelyezkedve - lelassítják a transzláció menetét, időt hagyva a fehérje-domain feltekeredésére.

Mindezek ismeretében egy szintetikus gén tervezésekor ma már a korábbiaknál több szempontot lehetne figyelembe venni, amihez a computer software-fejlesztések is nagyban hozzájárulnak.

A génexpresszió szintje és a fehérjeszekréció viszonya

Kísérleteink első szakaszában kialakítottunk egy élesztő vektor-gazda-rendszert, melyről bebizonyítottuk, hogy képes a rekombináns HSA termelésére. Törekvéseinkkel ellentétben ez a rendszer nem volt képes az rHSA-t a tápközegbe juttatni. Feltételezéseink szerint a *PHO5*-szekréciós szignálszekvencia csupán a külső sejtmembránon juttatta át az aránylag nagy méretű rekombináns fehérjét, de a sejtfal már átjárhatatlannak bizonyult számára. Így az érett rHSA a periplazmatikus térben halmozódott fel. Feltevésünk azon a kísérleti eredményen alapul, hogy az alkalmazott drasztikus (ismételt ultrahangos feltárás) és kevésbé drasztikus (üveggyöngyös rázatás) sejtfeltárási módszerek eltérő összetételű immunreaktív fehérjemintákat eredményeztek (lásd Eredmények 2.5.2 pont).

A kísérletek következő szakaszában a génexpresszió fokozása volt a célunk. Ezért a *PHO5*-promótert a legerősebb élesztőpromóterek közé tartozó konstitutív *GAPDH*-promóterre cseréltük ki.

Az újabb konstrukcióval transzformált élesztősejtek minimál tápoldatban tapasztalt rendkívül lassú szaporodása és a fénymikroszkópos vizsgálatok során megfigyelhető nagyarányú sejthalálozás alapján azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy az erős promóter és a leucinszelekciót biztosító nagy plazmid-kópiaszám (lásd Eredmények 1.6. pont) olyan nagy mennyiségű HSA termelődését tette lehetővé, melynek szekréciója lehetetlenné vált a sejtek számára. A felhalmozódó HSA, feltehetően, mintegy eltömte a szekréciós útvonalakat, és a sejtekben rekedő idegen fehérje megölte az élesztősejteket. Tehát az erős promóter, a nagy plazmid-kópiaszám és a fehérjetermék szekréciója nem volt összeegyeztethető.

Feltételezéseinket alátámasztotta az a tény is, hogy a leucinszelekcióról az uracilszelekcióra való áttérés megoldotta a transzformáns sejtek felszaporításának problémáját.

Az *URA3*-gén akár egy kópiában is képes auxotrófiát komplementálni. Így lehetővé vált a plazmid-kópiaszám lecsökkenése és feltételezzük, hogy a genetikai szegregáció során azok a sejtek maradtak életben és szaporodtak tovább, melyekben annyi HSA termelődött, amennyit a sejt képes volt szekretálni.

Képes-e a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő autentikus rekombináns HSA-t termelni?

Munkánk során a fő szempontok egyike volt, hogy az rHSA-t az élesztősejtek szekréciós útvonalukon keresztül termeljék. Ez gazdasági és sejtbiológiai szempontból egyaránt előnyös.

A bevezetőben említettem, hogy a vér frakcionálásával előállított HSA egységenkénti ára viszonylag alacsony. A fermentorokból nyerhető HSA árának versenyképesnek kell lennie. Ennek egyik feltétele pl., hogy az rHSA-t a fermentléből, a sejtek feltárása nélkül lehessen tisztítani, és *in vitro* módosítására ne legyen szükség.

A sejtbiológiai szempontok közül az egyikre éppen kísérleteink hívták fel a figyelmet. Eszerint a HSA valószínűleg toxikus hatású, ha az élesztősejtekben nagyobb mennyiségben felhalmozódik.

Egy további szempont a heterológ génexpressziós kísérletek során szerzett tapasztalatokból adódott. A sejtekben termelődő fehérjék végleges előfordulási helyük szerint lehetnek citoplazmásak, vakuolárisak vagy szekretáltak. Ennek megfelelően a prekurzor fehérjék meghatározott szerkezeti sajátosságokkal rendelkeznek. Így a citoplazmában felhalmozódó fehérjék jellemzője, hogy életük bizonyos szakaszában az eukarióta organizmusokban előforduló legkonzerváltabb fehérjével, az ubiquitinnel képeznek konjugátumot (Barr és mtsi., 1988). A vakuólumokban lokalizálódó fehérjék vakuoláris szignálokkal rendelkeznek (Valls és mtsi., 1987), az extracellulárisan termelődők szignálpeptidjeiről pedig részletesen volt szó a bevezetőben.

Heterológ fehérjék expressziója esetén, úgy tűnik, célszerű figyelembe venni ezeket a sajátosságokat. Az élesztőkkel végzett legsikeresebb heterológ génexpressziós kísérletek azok voltak, melyekben az idegen géneket természetes előfordulási helyüknek megfelelően expresszálták.

A HSA az emberi májsejtekben termelődő szekretált fehérje, így valószínűleg az a legoptimálisabb megoldás, ha az élesztősejtekkel is szekretált formában termeltetjük.

Eredményeink alapján ez a megközelítés helyes volt. A szintetikus gén által kódolt HSA az élesztő szekréciós útvonalát bejárva átesett a szükséges poszttranszlációs módosításokon:

a.) N-terminális szignálpeptidje a kívánt helyen lehasadt, az emberi szervezetben termelődő érett albumin N-terminálisával megegyező aminosavszekvenciát eredményezve;

b.) a tisztított rHSA molekulasúlya megegyezett a forgalomban lévő vérkészítmény molekulasúlyával, ami arra enged következtetni, hogy az rHSA kémiailag ugyanúgy nem glikozilált, ahogy a természetes HSA sem. Ez annál is

figyelemreméltóbb, mert N-glikozilálási helyek ugyan nincsenek a fehérjén, de potenciális O-glikozilálási helyek előfordulnak rajta. Feltehetően a fehérje térbeli konformációja gátolta a cukoroldalláncok kapcsolódását.

c.) Az rHSA diszulfid-híd-mintázata szintén azonos a természetes HSA-éval, amit a cirkuláris dikroizmus-vizsgálatok (melyeket Soós József [SZBK, Biofizikai Intézet] végzett el) bizonyítottak.

Azonosítatlan fehérjetermékek

Máig megoldatlan probléma azoknak az anti-HSA-szérummal reagáló fehérjéknek azonosítása, melyek a 67 kD mólsúlyú, bizonyítottan HSA mellett megjelentek mind a termelő sejtek tápoldatának, mind a sejtek lizátumának immuno-blot-analízisekor.

A 47 kD-os fehérjéről, melyet a *GAPDH*-promótert tartalmazó HSA-expressziós vektorral transzformált sejtek felülúszójában mutattunk ki (27 ábra), feltételezzük, hogy a HSA denaturált, de nem teljesen redukált formája, és a megmaradó diszulfid-hidak miatt tömörebb fehérje futási sebessége nagyobb, mint a tökéletesen redukáltté.

Az ugyanezen sejtek lizátumában talált immunreaktív, 30 kD-os fehérje, feltételezéseink szerint vagy az élesztő egy saját celluláris fehérjéje, mely képes anti-HSA-szérummal reagálni, vagy az rHSA egy degradációs terméke.

Az a 70 kD-os fehérje pedig, melyet a *PHO5*-promóterrel működő rekombináns sejtek lizátumában találtunk (15. ábra), valószínűleg még nem hasított intracelluláris HSA, mely tartalmazza a *PHO5*-gén 17 aminosavból álló szignálpeptidjét.

Plazmidstabilitás, méretnagyítás

A laboratóriumi kísérletek során rázatott folyadéktenyészetekkel dolgoztunk, miközben a sejtfelülúszóból és a sejtek lizátumából nyerhető HSA minőségi és mennyiségi vizsgálata mellett a plazmidstabilitást is ellenőriztük.

A rázatott folyadéktenyészetekben az aminosavakkal kiegészített minimál tápoldatban elérhető legnagyobb sejtdenzitás $OD_{600} \approx 3$ volt, mely értéknél a plazmidstabilitás 100%-osnak tekinthető.

A következő lépés a laboratóriumi szintű fermentálás volt. Az eredmények azt mutatták, hogy a fermentorokból kinyerhető rHSA mennyisége kb. 20-szorosa a rázatott folyadéktenyészetekben kapott mennyiségnek. Az aminosavakban gazdag (uracilmentes), szelektív minimál tápfolyadékban a rekombináns

élesztősejtek 105-120 mg/l HSA-t szekretáltak.

Megfigyeltük azonban, hogy a fermentorokban a plazmidstabilitás lecsökkent. Ez azzal magyarázható, hogy a fementáláskor elérhető $OD_{600} \approx$ 90-100 sejtdenzitási érték mellett az élesztősejtek lizálása megindult, és az "átetetés" jelenségének következtében csökkent a plazmidokat tartalmazó sejtekre ható szelekciós nyomás.

A laboratóriumi szintű fermentációs kísérleteket az ipari szintre történő méretnagyítás követheti.

Az eddig elvégzett kvalitatív és kvantitatív vizsgálatok eredményei a laboratóriumunkban konstruált HSA-expressziós vektor-gazda-rendszert érdemessé teszik az ipari felhasználásra.

Ehhez azonban további vizsgálatokat kell elvégezni, melyek végérvényesen bebizonyítják, hogy az élesztősejtek által termelt rHSA a természetessel megegyező, autentikus fehérje, és az emberi szervezetbe juttatva nem immunogén.

A rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* által szekretált HSA törzskönyvezéséhez szükséges vizsgálatok - melyek részben megtörténtek, részben folyamatban vannak - a következők:

- ELISA
- SDS-PAGE
- immun-elektroforézis (natív, nem redukált, stb.)
- a HSA *in vivo* radioaktív jelölése (^{14}C-Leu, ^{35}S-Cys)
- CD spektroszkópia (ligand-kötés, másodlagos szerkezet)
- N-terminális szekvenálás
- poliklonális és monoklonális antitestek használata (pre-pro-HSA- és rHSA-származékok elemzése)
- diszulfid-hidak szekvenálása és azok térképezése
- preklinikai vizsgálatok (immunogenitás).

IRODALOMJEGYZÉK

Abarca, D., Fernández-Lobato, M., Claros, M.G., del Pozo, L. and Jiménez, A.: Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an α-amylase gene from *Schwanniomyces occidentalis*. Yeast 4 (1988) S137 (Abstr.).

Aho, S., Paloheimo, M. and Korhola, M.: Expression of cellulase cDNAs in yeast. Studies with monoclonal antibodies. Yeast 4 (1988) S138 (Abstr.).

Andreadist, A., Hsu, Y-P., Hermodson, M., Kohlhaw, G. and Schimmel, P.: Yeast *Leu2*. Repression of mRNA levels by leucine and primary structure of the gene product. J. Biol. Chem. (1984) 8059-8062.

Andreassen, J., Aspholm, T.A., Smerud, K.T., Gabrielsen, O.S. and Oyen, T.B.: Vectors for maximizing the expression of heterologous protein genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S139 (Abstr.).

Arima, K., Oshima, T., Kubota, I., Nakamura, N., Mizunaga, T. and Toh-e, A.: The nucleotide sequence of the yeast *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a single peptide. Nucl. Acids. Res. 11 (1983) 1657-1672.

Bajszár, Gy., Horváth, É., Niemi, H., Kálmán, M. and Simoncsits, A.: Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and purification of human serum albumin. Yeast 4 (1988) S141 (Abstr.).

Bajwa, W., Meyhack, B., Rudolph, H., Schweingruber A-M. and Hinnen, A.: Structural analysis of two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast. Nucl. Acids Res. 12 (1984) 7721-7739.

Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesareni, G. and Galeotti, C.: A novel peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1ß in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 6 (1987) 229-234.

Bankier, A.T., Weston, K.M. and Barrell, B.G.: Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. Methods Enzymol. 155 (1987) 51-93.

Barr, P.J., Cousens, L.S., Lee-Ng, C.H., Medina-Selby, A., Masiarz, F.R., Hallewell, R.A., Chamberlain, S.H., Bradley, J.D., Lee, D., Steimer, K.S., Poulters, L., Burlingame, A.L., Esch, F. and Braid, A.: Expression and processing of biologically active fibroblast growth factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 263 (1988) 16471-16478.

Barr, P.J., Gibson, H.L., Enea, V., Arnot, D.E., Hollingdale, M.R. and Nussenzweig, V.: Expression in yeast of a *Plasmodium vivax* antigen of potential use in a human malaria vaccine. J. Exp. Med. 165 (1987) 1160-1171.

Barr, P.J., Shuster, J.R., Bathurst, I.C., Cousens, L.S., Lee-Ng, C.T., Gibson, H.L. and Sabin, E.A.: Production of recombinant DNA-derived pharmaceuticals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S24 (Abstr.).

Barsh, G.S. and Byers, P.H.: Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 5142-5146.

Bathurst, I.C., Brennan, S.O., Carrell, R.W., Cousens, L.S., Brake, A.J. and Barr, P.J.: Yeast KEX2 protease has the propeties of a human proalbumin converting enzyme. Science 235 (1987) 348-350.

Becker, G.W. and Hsiung, H.M.: Expression, secretion and folding of human growth hormone in *E. coli*. FEBS Lett. 204 (1986) 145-150.

Beggs, J.D.: Multiple-copy yeast plasmid vectors, in von Wettstein, D., Friis, J., Kielland-Brandt, M. and Standerup, A. (Eds.), Molecular Genetics in Yeast. Alfred Benson Symposium No. 16. Munksgaard, Copenhagen, 1981, pp. 383-395.

Benitez, J., Silva, A., Vazquez, R., Noa, M.D. and Hollenberg, C.P.: Secretion and glycosylation of *Clostridium thermocellum* endoglucanase A encoded by *celA* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 5 (1989) 299-306.

Bennetzen, J.L. and Hall, B.D.: Codon selection in yeast. J. Biol. Chem. 257 (1982) 3026-3031.

Bialy, H.: Recombinant proteins: virtual autenticity. Bio/Technology 5 (1987) 883-890.

Birnboim, H.C.: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100 (1983) 243-255.

Bitter, G.A. and Egan, K.M.: Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. Gene 32 (1984) 263-274.

Bitter, G.A. and Egan, K.M.: Expression of interferon-gamma from hybrid yeast *GPD* promoters containing upstream regulatory sequences from the *GAL1-GAL10* intergenic region. Gene 69 (1988) 193-207.

Bitter, G.A., Chen, K.K., Banks, A.R. and Lai, P-H.: Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by α-factor gene fusions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 5330-5334.

Bitter, G.A., Egan, K.M., Koski, R.A., Jones, M.O., Elliott, S.G. and Giffin, J.C.: Expression and secretion vectors for yeast. Methods enzymol. 153 (1987) 516-544.

Bitter, G.A.: Heterologous gene expression in yeast. Methods enzymol. 152 (1987) 673-684.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.L., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W.: Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. Gene 2 (1977) 95-113.

Botstein, D. and Fink, G.: Yeast: an experimental organism for modern biology. Science 240 (1988) 1439-1443.

Boyd, A.: The secretion of proteins from yeast. (kézirat; 1985).

Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P. and Barr, P.J.: α-factor directed synthesis and secretin of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 4642-4646.

Cabezón, T., De Wilde, M., Herion, P., Loriau, R. and Bollen, A.: Expression of human α1-antitrypsin cDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81. (1984) 6594-6598.

Cantwell, B.A., Ryan, T., Hurley, J.C. and McConnell, D.J.: Secretion of ß-glucanase by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2 (1986) S52 (Abstr.).

Carter, D.C., He, X-M., Munson, S.H., Twigg, P.D., Gernert, K.M., Broom, M.B. and Miller, T.Y.: Three-dimension structure of human serum albumin. Science 244 (1989) 1195-1198.

Castañón, M.J., Spevak, W., Adolf, G.R., Chlebowicz-Sledziewska, E. and Sledziewski, A.: Cloning of human lysozyme gene and expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 66 (1988) 223-234.

Chang, C.N., Matteucci, M., Perry, L.J., Wulf, J.J., Chen, C.Y. and Hitzeman, R.A.: *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides. Mol. Cell. Biol. 6 (1986) 1812-1819.

Clark, S.G., McGrath, J.P. and Levinson, A.D.: Expression of normal and activated human Ha-*ras* c-DNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 5 (1985) 2746-2752.

Cooper, J.A. and Moss, B.: *In vitro* translation of immediate early, early, and late classes of RNA from Vaccinia virus-infected cells. Virology 96 (1979) 368-380.

Cousens, L.S., Shuster, J.R., Gallegos, C., Ku, L., Stempien, M.M., Urdea, M.S., Sanchez-Pescador, R., Taylor, A. and Tekamp-Olson, A.: High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 61 (1987) 265-275.

Cramer, J.H., Lea, K. and Slightom, J.L.: Expression of phaseolin cDNA genes in yeast under the control of natural plant DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 334-338.

Crumplen, R., D'Amore, T., Panchal, C.J., Russel, I. and Stewart, G.G.: Industrial uses of yeast - present and future. Yeast 5 (1989) S3 (Abstr.).

Derynck, R., Singh, A. and Goeddel, D.V.: Expression of the human interferon-τ cDNA in yeast. Nucl. Acids Res. 11 (1983) 1819-1837.

Deshaies, R.J., Kepes, F. and Böhni, P.C.: Genetic dissection of the early stages of protein secretion in yeast. Trends Genet. 5 (1989) 87-93.

Dobson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M.: Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res. 10 (1982) 2625-2637.

Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Dahlems, U.M., Seeboth, P.G. and Hollenberg, C.P.: Cloning and heterologous expression of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene. Yeast 4 (1988) S145 (Abstr.).

Dumont, J., Legrain, M., Portetelle, D., Burny, A. and Hilger, F.: Expression of the gene coding for the Bovine Leukemia Virus (BLV) major internal protein p24 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S146 (Abstr.).

Elliott, S.G. and Giffin, J.C.: Secretion of a heterologous glycoprotein from yeast by the pre-pro alpha factor leader region. Yeast 2 (1986) S101 (Abstr.).

Ernst, J.F.: Improved secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of promoter substitution in alpha-factor fusions. DNA 5 (1986) 483-491.

Ernst, J.F.: Codon usage and gene expression. Trends Biotechnol. 6 (1988) 196-199.

Etcheverry, T., Forrester, W. and Hitzeman, R.: Regulation of the chelatin promoter during the expression of human serum albumin or yeast phosphoglicerate kinase in yeast. Bio/Technology 4 (1986) 726-730.

Fincham, J.R.S.: Transformation in fungi. Microbiol. Rev. 53 (1989) 148-170.

Fogel, S. and Welch, J.W.: Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5342-5346.

Futcher, A.B.: The 2 μm circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) 27-40.

Gabrielsen, O.S., Reppe, S., Sæther, O., Hogset, A., Blingsmo, O.R., Alestrom, P., Oyen, T.B. and Gautvik, K.M.: Expression and secretion of biologically active human parathyroid hormone in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S147 (Abstr.).

Gardell, S.J., Craik, C.S., Hilvert, D., Urdea, M.S. and Rutter, W.J.: Site-directed mutagenesis shows that tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis. Nature 317 (1985) 551-555.

Gorman, J.A., Smith, H.E., Koltin, Y. and Gorman, J.W.: Expression of the *Candida albicans* beta-tubulin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S149 (Abstr.).

Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166 (1983) 557-580.

Hartley, J.L. and Donelson, J.E.: Nucleotide sequence of the yeast plasmid. Nature 286 (1980) 860-864.

Heuterspreute, M., Ha-Thi, V., Emery, S., Tournis-Gamble, S., Kennedy, N. and Davison, J.: Vectors with restriction site banks, IV. pJRD184, a 3793-bp plasmid vector having 43 unique cloning sites. Gene 39 (1985) 299-304.

Hinchliffe, E. and Box, W.G.: Expression of the cloned endo-1,3-1,4-ß-glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 8 (1984) 471-475.

Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R.: Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1929-1933.

Hitzeman, R.A., Chen, C.Y., Hagie, F.E., Patzer, E.J., Liu, C-C., Estell, A., Miller, J.V., Yaffe, A., Kleid, D.G., Levinson, A.D. and Oppermann, H.: Expression of hepatitis B virus surface antigen in yeast. Nucl. Acids Res. 11 (1983a) 2745-2763.

Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goeddel, D.V., Ammerer, G. and Hall, B.D.: Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293 (1981) 717-722.

Hitzeman, R.A., Leung, D.W., Perry, L.J., Kohr, W.J., Levine, H.L. and Goeddel, D.V.: Secretion of human interferons by yeast. Science 219 (1983b) 620-625.

Holland, J.P. and Holland, M.J.: Structural comparision of two nontandemly repeated yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. J. Biol. Chem. 255 (1980) 2596-2605.

Holland, J.P. and Holland, M.J.: The primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 254 (1979) 9839-9845.

Holland, J.P., Labieniec, L., Swimmer, C. and Holland, M.J.: Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. J. Biol. Chem. 258 (1983) 5291-5299.

Holloway, P.W.: A simple procedure for removal of triton X-100 from protein samples. Anal. Biochem. 53 (1973)

Holm, C., Meeks-Wagner, D.W., Fangman, W.L. and Botstein, 304-308.D.: A rapid efficient method for isolating DNA from yeast. Gene 42 (1986) 169-173.

Hsiao, C.L., Domber, E., Dheer, S., Hung, P. and Davis, A.: Expression and processing of rotavirus glycoprotein VP7 in yeast. Yeast 2 (1986) S165 (Abstr.).

Innis, M.A., Holland, M.J., McCabe, P.C., Cole, G.E., Wittman, V.P., Tal, R., Watt, K.W.K., Gelfand, D.H., Holland, J.P. and Meade, J.H.: Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. Science 228 (1985) 21-26.

Inouye, M. and Halegoua, S.:Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli*. Crit. Rev. Biochem. 7 (1979) 339-371.

Jabbar, M.A., Sivasubramanian, N. and Nayak, D.P.: Influenza viral (A/WSN/33) hemagglutinin is expressed and glycosylated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 2019-2023.

Jackson, S., Sogn, J.A. and Kindt, T.J.: Microdetermination of rabbit immunoglobulin allotypes by ELISA using specific antibodies conjugated with peroxidase or with biotin. J. Immunol. Methods 48 (1982) 299-309.

Jacobs, E., Gheysen, D., Francotte, M., Thines, D. and De Wilde, M.: Expression of the HIV core antigen precursor (p55) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, evidence of myristilation and determination of subcellular localization of the protein in the region of the cell plasma membrane. Yeast 4 (1988) S152 (Abstr.).

Jemtland, R., Finstad, H.S., Andersen, K., Gabrielsen, O.S. and Oyen, T.B.: Expression of influenza hemagglutinin in yeast. Yeast 4 (1988) S156 (Abstr.).

Jigami, Y., Muraki, M., Harada, N. and Tanaka, H.: Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. Gene 43 (1986) 273-279.

Jimenez, A. and Davies, J.: Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 287 (1980) 869-871.

Kálmán, M., Cserpán, I., Bajszár, Gy., Dobi, A., Horváth, É., Pázmán, C. and Simoncsits,A.: Synthesis of a gene for human serum albumin and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res. 18 (1990) 6075-6081.

Käppeli, O., Weber, J., Zurbriggen, B. and Sanglard, D.: Maximizing heterologous gene expression in yeast. Yeast 4 (1988) S159 (Abstr.).

Keränen, S.: Synthesis and processing of Semliki forest virus polyprotein in *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast type glycosylation of E1 envelope protein. Gene 48 (1986) 267-275.

Kingsman, S.M., Kingsman, A.J. and Mellor, J.: The production of mammalian proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Trends Biotechnol. 5 (1987) 53-57.

Kirkham, J.A., Mileham, A.J., Wilde, R.J., Howard, J.J. and Lancashire, W.E.: Stabilisation of heterologous proteins in Yeast. Yeast 4 (1988) S157 (Abstr.).

Kramer, R.A., DeChiara, T.M., Schaber, M.D., Hilliker, S.: Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 367-370.

Kramer, R.A., Schaber, M.D.,Skalka, A.M., Ganguly, K., Wong-Staal, F. and Reddy, E.P.: HTLV-III gag-protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease. Science 231 (1986) 1580-1584.

Kurjan, J. and Herskowitz, I.: Structure of a yeast pheromone gene (*MFα*): a putative α-factor precursor contains four tandem copies of mature α-factor. Cell 30 (1982) 933-943.

Laemmly, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970) 680-685.

Lancashire, W.E. and Wilde, R.J.: Secretion of bacterial ß-glucanase from yeast. Yeast 2 (1986) S205 (Abstr.).

Langley, K.E., Egan, K.M., Barendt, J.M., Parker, C.G. and Bitter, G.A.: Characterization of purified hepatitis B surface antigen containing pre-S(2) epitopes expressed in *Saccharomyces cervisiae*. Gene 67 (1988) 229-245.

Latta, M., Knapp, M., Sarmientos, P., Bréfort, G., Becquart, J., Guerrier, L., Jung, G. Mayaux, J-F.: Synthesis and purification of mature human serum albumin from *E. coli*. Bio/Technology 5 (1987) 1309-1314.

Lawn, R.M., Adelman, J., Bock, S.C., Franke, A.E., Houck, C.M., Najarian, R.C., Seeburg, P.H. and Wion, K.L.: The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. Nucl. Acids Res. 9 (1981) 6103-6114.

Legrain, M., Portetelle, D., Dumont, J., Bourdeaud'huy, J.L., Burny, A. and Hilger, F.: Expression of information from the gene coding for the bovine leukemia virus (BLV) glycoprotein gp51 in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2 (1986) S206 (Abstr.).

Livi, G.P., Ferrara, A., Gorman, J.A. and Young, P.R.: Secretion of human recombinant interleukin-1ß in yeast. Yeast 4 (1988) S446 (Abstr.).

Lopes, T.S., Klootwijk, J., Veenstra, A.E., van der Aar, P.C., van Heerikhuizen, H., Raué, H.A. and Planta, R.J.: High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharmyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. Gene 79 (1989) 199-206.

Maniatis, T., Fritsch, F.F. and Sambrook, J.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY,1982.

Mayes, E.L.V.: Immunoaffinity purification of protein antigens, in Walker, J.M. (Ed.), Methods in Molecular Biology 1: Proteins. Humana Press, Clifton, 1984, pp. 13-20.

Mellor, J., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Tuite, M.F., Emtage, J.S., White, S., Lowe, P.A., Patel, T., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M.: Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 24 (1983) 1-14.

Meyhack, B., Bajwa, W. Rudolph, H. and Hinnen, A.: Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences. EMBO J. 1 (1982) 675-680.

Mileham, A.J., Wales, R. and Boyd, A.: Secretion of bacterial ß-lactamase from *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of several yeast signal sequences. Yeast 2 (1986) S249 (Abstr.).

Mitraki, A. and King, J.: Protein folding intermediates and inclusion body formation. Bio/Technology 7 (1989) 690-697.

Miyajima, A., Bond, M.W., Otsu, K., Arai, K. and Arai, N.: Secretion of mature mouse interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: use of a general secretion vector containing promoter and leader sequences of the mating pheromone α-factor. Gene 37 (1985) 155-161.

Miyajima, A., Otsu, K., Schreurs, J., Bond, M.W., Abrams, J.S. and Arai, K.: Expression of murine and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in *S. cerevisiae*: mutagenesis of the potential glycosilation sites. EMBO J. 5 (1986) 1193-1197.

Miyamoto, C., Chizzonite, R., Crowl, R., Rupprecht, K., Kramer, R., Schaber, M., Kumar, G., Poonian, M. and Ju, G.: Molecular cloning and regulated expression of the human *c-myc* gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82. (1985) 7232-7236.

Miyanohara, A., Toh-E, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N. and Matsubara, K.: Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 1-5.

Montgomery, D.L., Kniskern, P.J., Hagopian, A., Burke, P., Dunn, N.R., Hofmann, K.J., Miller, W.J. and Ellis, R.W.: Synthesis and assembly of very high levels of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) particles in *S. cerevisiae*. Yeast 2 (1986) S252 (Abstr.).

Mullenbach, G.T., Tabrizi, A., Blacher, R.W. and Steimer, K.S.: Chemical synthesis and expression in yeast of a gene encoding connective tissue activating peptide-III. J. Biol. Chem. 261 (1986) 719-722.

Musti, A.M., Zehner, Z., Bostian, K.A., Paterson, B.M. and Kramer, R.A.: Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. Gene 25 (1983) 133-143.

Novick, P., Ferro, S. and Schekman, R.: Order of events in the yeast secretory pathway. Cell 25 (1981) 461-469.

Novick, P., Field, C. and Schekman, R.: Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. Cell 21 (1980) 205-215.

Oberto, J. and Davison, J.: Expression of chicken egg white lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 40 (1985) 57-65.

Oeda, K., Sakaki, T. and Ohkawa, H.: Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA 4 (1985) 203-210.

Ohno, S.: Codon preference is but an illusion created by the construction principle of coding sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85. (1988) 4378-4382.

Pines, O., Lunn, C.A. and Inouye, M.: Expression, processing and secretion of *E. coli* prolipo-ß-lactamase in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2 (1986) S299 (Abstr.).

Purvis, I.J., Bettany, A.J.E., Santiago, T.C., Coggins, J.R., Duncan, K., Eason, R. and Brown, A.J.P.: The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation *in vivo*. A hypothesis. J. Mol. Biol. 193 (1987) 413-417.

Rosenberg, S., Barr, P.J., Najarian, R.C. and Hallewell, R.A.: Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human α1-antitrypsin. Nature 312 (1984) 77-80.

Rothstein, S.J., Lazarus, C.M., Smith, W.E., Baulcombe, D.C. and Gatenby, A.A.: Secretion of wheat α-amylase expressed in yeast. Nature 308 (1984) 662-665.

Rudolph, H. and Hinnen, A.: The yeast *PHO5* promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 1340-1344.

Ruohonen, L., Hackman, P., Lehtovaara, P., Knowles, J.K.C. and Keränen, S.: Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α-amilase cells by its own signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* host. Gene 59 (1987) 161-170.

Sabin, E.A., Barr, P.J., Shuster, J.R. and Steimer, K.S.: Expression of Human Immunodeficiency Virus type I (HIV-I) envelope genes in the yeast *Saccheromyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S165 (Abstr.).

Sabin, E.A., Lee-Ng, C.T., Shuster, J.R. and Barr, P.J.: High-level expression and in vivo processing of chimeric ubiquitin fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Bio/Technology 7 (1989) 704-705.

Sambucetti, L.C., Schaber, M., Kramer, R., Crowl, R. and Curran, T.: The *fos* gene product undergoes extensive post-translational modification in eukaryotic but not in procaryotic cells. Gene 43 (1986) 69-77.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467.

Saunders, C.W., Schmidt, B.J., Mallonee, R.L. and Guyer, M.S.: Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 169 (1987) 2917-2925.

Scarpulla, R.C. and Nye, S.H.: Functional expression of rat cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 6352-6356.

Schleicher és Schuell: Transfer and immobilization of nucleic acids to S&S solid supports. Schleicher and Schuell, Inc. (1987) Printed in U.S.A.

Shuster, J.R., Dennis, A., Lee, H., Merryweather, J.P., Moyer, D.L. and Smith, B.: A classical genetic analysis of heterologous gene expression resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) 167.

Singh, A., Lugovoy, J.M., Kohr, W.J. and Perry, L.J.: Synthesis, secretion and processing of α-factor-interferon fusion proteins in yeast. Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8927-8938.

Skipper, N., Sutherland, M., Davies, R.W., Kilburn, D., Miller, J.R., R.C., Warren, A. and Wong, R.: Secretion of bacterial cellulase by yeast. Science 230 (1985) 958-960.

Sleep, D., Belfield, G.P. and Goodey, A.R.: The secretion of human serum albumin by *Saccharomyces cerevisiae*. The effect of secretory leader substitution. Yeast 4 (1988) S168 (Abstr.).

Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T.: Heterologous protein secretion from yeast. Science 229 (1985) 1219-1224.

Steube, K., Chaudhuri, B. and Heim, J.: Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I) in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S169 (Abstr.).

Struhl, K.: Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. Cell 49 (1987) 295-297.

Suzuki, K., Ichikawa, K. and Jigami, Y.: Yeast mutants supersecreting human lysozyme: isolation of mutants and identification of a mutation affecting proteinase activity. Yeast 4 (1988) S170 (Abstr.).

Tanaka, Y., Ashikari, A., Shibano, Y., Amachi, T., Yoshozumi, Y. and Matsubara, H.: Functional expression of human cytochrome c in yeast. Yeast 4 (1988) S171 (Abstr.).

Tanner, W. and Lehle, L.: Protein glycosylation in yeast. Biochim. Biophys. Acta 906 (1987) 81-99.

Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R. and Thorner, J.: Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. Science 241 (1988) 226-230.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350-4354.

Tuite, M.F., Dobson, M.J., Roberts, N.A., King, R.M., Burke, D.C., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J.: Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 1 (1982) 603-608.

Urdea, M.S., Merryweather, J.P., Mullenbach, G.T., Coit, D., Heberlein, U., Valenzuela, P. and Barr, P.J.: Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in the yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 7461-7465.

Vainio, A., Kopu, H., Sirpa, A., Fagerström, R., Torkkeli, T. and Korhola, M.: Cloning of fungal glucoamylase cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S172 (Abstr.).

Valenzuela, P., Coit, D. and Kuo, C.H.: Synthesis and assembly in yeast of hepatitis B surface antigen particles containing the polyalbumin receptor. Bio/Technology 3 (1985a) 317-320.

Valenzuela, P., Coit, D., Medina-Selby, M.A., Kuo, C.H., Van Nest, G., Burke, R.L., Bull, P., Urdea, M.S. and Graves, P.V.: Antigen engineering in yeast: synthesis and assembly of hybrid

hepatitis B surface antigen-herpes simplex 1 gD particles. Bio/Technology 3 (1985b) 323-326.

Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. and Hall, B.D.: Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature 298 (1982) 347-350.

Valls, L.A., Hunter, C.P., Rothman, J.H. and Stevens, T.H.: Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in propeptide. Cell 48 (1987) 887-897.

Van Brunt, J.: Fungi: the perfect hosts? Bio/Technology 4 (1986) 1057-1062.

Van Den Bergh, C.J., Bekkers, A.C.A.P.A., De Geus, P., Verheij, H.M. and De Haas, G.H.: Secretion of biologically active porcine prophospholipase A_2 by *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 170 (1987) 241-246.

Vaughan, P.R., Macreadie, I.G., Irving, R., Azad, A. and Jagadish, M.N.: Expression of Infectious Bursal Disease Virus antigens in yeast. Yeast 4 (1988) S174 (Abstr.).

Verbakel, J.M.A., Dekker, K.A., Rutgers, C.A., Jore, J.P.M., Kottenhagen, M.J., Pouwels, P.H. and Enger-Valk, B.E.: Expression of the capsid polypeptide VP2 of Polio-virus type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2 (1986) S405 (Abstr.).

Vlasuk, G.P., Bencen, G.H., Scarborough, R.M., Tsai, P-K., Whang, J.L., Maack, T., Camargo, M.J.F., Kirsher, S.W. and Abraham, J.A.: Expression and secretion of biologically active human atrial natriuretic peptide in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 261 (1986) 4789-4796.

Wagenbach, M., O'Rourke, K., Vitez, L., Wieczorek, A, Hoffman, S., Durfee, S., Tedesco, J. and Stetler, G.: Synthesis of wild type and mutant human hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. Bio/Technology 9 (1991) 57-61.

Webster, T.D. and Dickson, R.C.: Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn*903*. Gene 26 (1983) 243-252.

Wen, D. and Schlesinger, M.J.: Regulated expression of Sindbis and vesicular stomatitis virus glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 3639-3643.

Wickner, W.T. and Lodish, H.F.: Multiple mechanisms of protein insertion into and across the membranes. Science 230 (1985) 400-407

Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R.: The use of proteinase mutants of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced production of heterologous gene products. Yeast 4 (1988) S178 (Abstr.).

Wood, C.R., Boss, M.A., Kenten, J.H., Calvert, J.E., Roberts, N.A. and Emtage, J.S.: The synthesis and *in vivo* assembly of functional antibodies in yeast. Nature 314 (1985) 446-449.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33 (1985) 103-119.

Zsebő, K.M., Lu, H-S., Fieschko, J.C., Goldstein, L., Davis, J., Duker, K., Suggs, S.V., Lai, P-H. and Bitter, G.A.: Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro-α-factor leader region. J. Biol. Chem. 261 (1986) 5858-5865.

Zurbriggen, B., Kallio, P., Sanglard, D., Böhlen, E., Käppeli, O. and Fiechter, A.: Expression of a rat liver cytochrome P450e cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 4 (1988) S180 (Abstr.).

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Amp	-	ampicillin
APS	-	ammonium-peroxid-diszulfát
ARS	-	autonomously replicating sequence (kromoszómális eredetű replikációs origó)
bp	-	bázispár
BSA	-	szarvasmarha szérumalbumin
CNBr	-	cianogén-bromid
dATP	-	dezoxiadeozintrifoszfát
dCTP	-	dezoxicitidintrifoszfát
ddATP	-	didezoxiadeozintrifoszfát
ddCTP	-	didezoxicitidintrifoszfát
ddGTP	-	didezoxiguanozintrifoszfát
ddNTP	-	didezoxiribonukleozidtrifoszfát
ddTTP	-	didezoxitimidintrifoszfát
dGTP-	-	dezoxiguanozintrifoszfát
DNS	-	dezoxiribonukleinsav
dNTP	-	dezoxiribonukleozidtrifoszfát
DTT	-	ditio-treitol
dTTP	-	dezoxitimidintrifoszfát
EDTA	-	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	-	Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay
ER	-	endoplazmatikus retikulum
		eredetű replikációs szekvencia
Et-OH	-	etil-alkohol
FPLC	-	fast performance liquid chromatography
GuHCl	-	guanidin-hidroklorid
HBsAg	-	Hepatitisz-B vírus felszíni antigén
HSA	-	humán szérumalbumin
IFN	-	interferon
IPTG	-	izopropil-tio-galaktozid
MES	-	morfolin-etán-szulfonsav
MOPS	-	morfolin-propán-szulfonsav
mRNS	-	hírvivő (messenger) RNS
OPD	-	orto-fenilén-diamin
ori	-	replikációs origó
PEG	-	polietilén-glikol
Pi	-	inorganikus foszfát
PMSF	-	fenil-metil-szulfonil-fluorid

PVP	-	poli-vinil-pirrolidon
R	-	(felső indexként) rezisztencia
rHSA	-	rekombináns HSA
RN-áz	-	ribonukleáz
RNS	-	ribonukleinsav
rRNS	-	riboszómáls RNS
SDS	-	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	-	SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis
SF	-	savanyú foszfatáz
TMED	-	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
Trisz	-	trisz-(hidroximetil)-aminometán
U	-	egység (unit)
UAS	-	upstream activation site (upstream aktivátorelem)
X-Gal	-	5-bróm-4-klór-3-indol-ß-D-galaktozid
αF	-	α-faktor

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban leírt munkát a Biotechnika R.T. Szegedi Fejlesztőlaboratóriumában végeztem, mely sajnos már megszűnt, kutatói a világ számos országában dolgoznak.

Mindenekelőtt köszönetet mondok Dr. Bajszár Györgynek, egykori kutatócsoportunk vezetőjének, aki sokoldalú, értékes elméleti és gyakorlati tanácsaival mindvégig segítette, irányította munkámat.

Dolgozatom és kísérleteim egy csoportmunka részét képezik, ezért hálával gondolok mindazokra, akik az eredmények megszületésében segítségemre voltak.

Külön köszönettel tartozom Dosztig Monikának és Nagy Lajos Gergelynek, akik a dolgozat ábraanyagának elkészítésében nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Maróy Péternek, aki új munkahelyemen lehetővé tette számomra a dolgozat befejezését.

Végül köszönet illeti a Skandigen AB-t (Stockholm), mely munkánk egy részét anyagilag támogatta.