



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 793 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 1852/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 03. 27.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
89303032.0 1989. 03. 28. EP

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 39/012
C 12 P 21/02

(40) A közzététel napja: 1991. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 04. 28.

(72) Feltalálók:

Clarke, Lorraine Elizabeth, Cumnor,
Cambridgeshire (GB)
Dijkema, Rein, Oss (NL)
Tomley, Fiona Margaret, Cambridge,
Cambridgeshire (GB)
Vermeulen, Arno, Cuyk (NL)

(73) Szabadalmas:

AKZO N. V., Arnhem (NL)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Eljárás coccidiosisvakcina előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás olyan proteinek előállítására, amelyek az *Eimeria tenella* immunológiai tulajdonságával rendelkeznek, és amelyek az *E. tenella* sporoiták elleni E. TEN 11P-2 monoklonális antitesttel reaktívak.

A találmány tárgya továbbá eljárás az ezen protein polipeptidfragmenseinek előállítására, amelyek alkal-

mazhatók *E. tenella* elleni immunizálásra. Ezek a proteinek és polipeptidek izolálhatók *E. tenella*-ból, vagy előállíthatók kémiai szintézissel vagy rekombináns DNS-módszerekkel.

A fenti proteineket, illetve azok fragmenseit vakcinakészítésre alkalmazzák.

HU 217 793 B

A találmány tárgya eljárás *Eimeria* fajok immunológiai tulajdonságaival rendelkező protein, annak fragmentumai, ezeket kódoló DNS-szekvenciák, az ezeket a DNS-szekvenciákat tartalmazó rekombináns vektorok és gazdaszervezetek, valamint az említett proteint vagy proteinfragmentumokat, vagy az ezeket kódoló DNS-t tartalmazó vakcinák előállítására.

A coccidiosis olyan betegség, amelyet az Apicomplexa subphylumba és *Elimeria* nemzetségbe tartozó intracelluláris paraziták és protozoák okoznak. Ezek a paraziták a gazdaállataik gasztrointesztinális traktusának és emésztőszerveinek sejtjeiben szaporodnak.

Az egyre fokozódó intenzív termelés következtében a baromfiiparban ezen paraziták által okozott kár riasztóan megnőtt az utolsó tíz évben. Hollandiában a baromfitermelők kára évente millió guilder nagyságrendű, 1986-ban a kár körülbelül 13 millió guilder volt. Ugyanabban az évben az Amerikai Egyesült Államokban a kár 300 millió dollár körül volt, a coccidiostatikumok alkalmazása ellenére.

Csirkék esetén a coccidiosisot okozó patogének kilenc fajba oszthatók, éspedig *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. mivati* és *E. hagai*. Néhányan azonban kétségbe vonják a két utolsó típus létezését. Ezeknek a fajoknak csak a csirke a gazdaállata, és ezek magas szövetszereplőséget mutatnak. Az említett típusok életciklusa azonban hasonló.

A fajok a csirkékre kifejtett patogén hatásukban különböznek egymástól, ahol a csirkék típusa szintén szerepet játszik. Így a brojlercsirkék nagyrészt az *E. acervulina* vagy *E. maxima* paraziták károsító hatásának vannak kitéve, mivel ezek a vékonybél nagy részében élősködnek, ahol a tápanyag emésztése nagy szerepet játszik.

Az *Eimeria* paraziták életciklusuk során számos formán mennek át. A fertőző forma (spórás oociszta) orálisan jut a csirkék gyomrába, ahol az emésztés hatására a ciszta héja felnyílik. Az oocisztában található négy darab sporociszta kiszabadul és a duodénumba jut, így ezek az epe- és emésztőenzimeknek vannak kitéve. Ennek hatására a sporocisztafalon egy nyílás keletkezik, így a sporocisztában található sporozoiták kiszabadulnak. Ezek a sporozoiták mozgékonyak, és alkalmas gazdasejtet, például epitéliumsejtet keresnek, ahová behatolnak, és ott szaporodnak. A típustól függően ez az első reprodukciós fázis 20–48 óra hosszat tart, és néhányszor tíztől százig terjedő merozoita képződik, amelyek mindegyike új gazdasejtbe hatol be és reprodukálódik. Kettőtől néhányszor ötig terjedő ilyen aszexuális reprodukciós ciklus után az intracelluláris merozoiták szexuális formába, hím és nő gametociták formájába mennek át. Miután egy hím gaméta megtermékenyít egy nő gamétát, egy zigóta képződik, amely maga körül cisztafalat képez. Ez az oociszta elhagyja a gazdasejtet, és a fekáliával kiürül. Ha a csirke testén kívül a hőmérséklet és a nedvességtartalom viszonylag magas, és ugyanakkor elegendő oxigén van a levegőben, az oociszta spórát képez és fertőző formába alakul.

Így intermedier gazdaállat nem szükséges ahhoz, hogy a parazita egyik csirkéből a másikba jusson. A területegységre jutó csirkék számával tehát a csirkefarmon a fertőzési veszély gyorsan növekszik.

5 A parazita különböző módokon küzdhető le.

A jó tartás mellett a coccidiosis különböző, coccidiosis elleni szerekkel küzdhető le, amelyeket többnyire a takarmányhoz vagy az ivóvízhez kevernek. Ezek a szerek azonban az utóbbi években veszítettek hatékonyságukból, részben azért, mert a parazita nagy genetikai kapacitásánál fogva rezisztenciát tud kifejleszteni a különböző coccidiosis elleni szerekkel szemben. Emellett ezen szereknek a maradéka megjelenik a húspan, amely fogyasztási problémákat okoz.

10 Ezért az immunológiai profilaxis jobb leküzdési módszer lenne. Ismeretes, hogy azok a csirkék, amelyek egy kellően nagy fertőzést átéltek, ellenállóak az ugyanolyan típusú *Eimeria*-fertőzéssel szemben. *Eimeria* elleni rezisztencia kifejleszthető úgy is, hogy az állatokat néhányszor kisebb dózissal oocisztával vagy gyengített (nem patogén) törzs oocisztájával fertőzzük. A kontrollált adagolás azonban különösen nagy számú vágóállat esetén szinte leküzdhetetlen probléma. Így egy megvalósítható megoldásnak látszik az inaktívált vakcina.

25 Az inaktívált vakcina a parazitából származó antigénből és adott esetben adjuvánsból áll.

A parazitából izolált antigén helyett alkalmazhatunk rekombináns DNS-technológiával előállított terméket.

30 Eljárhatunk úgy is, hogy az antigént vagy annak részeit szintetikusán állítjuk elő, és ezeket adagoljuk az állatoknak egy immunológiaiailag felismerhető és stimuláló formában, például adjuváns jelenlétében egy hordozóproteinhez kapcsolva.

35 Ezenkívül a vakcinálást végezhetjük úgy, hogy élő gazdaszervezetet adagolunk, például baktériumot, gombát vagy vírust, amely az antigént kódoló gént tartalmazza. Ez a szervezet azután az antigén kellően hosszú ideig tartó szintézisét biztosítja, így a csirke immunrendszere kellően stimulálódik.

40 A találmány értelmében előállíthatunk egy proteint, az Etp100 jelű proteint vagy annak fragmentumát, amelyek alkalmazhatók baromfik coccidiosis elleni immunizálására.

45 Az említett Etp100 protein *E. tenella* extraktumából izolálható úgy, hogy az extraktumot egy olyan oszlopra visszük fel, amely *E. TEN 11P-2* monoklonális antitestet tartalmaz, az extraktum adszorbeált frakcióját elválasztjuk a nem adszorbeált frakciótól, majd az adszorbeált frakciót ismert módon eluáljuk az oszlopról.

50 Az ezen immunkromatográfiás eljárással kapott proteint kívánt esetben tovább tisztítható a természetes anyagok tisztítására ismert módszerekkel.

55 Az *E. tenella*-ból így kapott Etp100 protein tulajdonságai a következők:

a) molekulatömeg SDS-PAGE-módszerrel meghatározva körülbelül 100 kD;

60 b) nemredukáló körülmények között kötődik a monoklonális *E. TEN 11P-2* antitesthez, redukálókörülmények között azonban nem;

c) megjelenik a spórázott oocisztában, sporocisztában, sporozoitában, első és második generációs szizontákból és a második generációs merozoitákból is.

A 100 kD tömegű protein izolálható sporozoitákból, valamint más forrásból nyert *E. tenella* merozoitákból is.

Ezenkívül Etp100-nak megfelelő proteinek izolálhatók más *Eimeria* fajokból is, mint például *E. maxima*-ból és *E. acervuliná*ból. Ezeknek a proteineknek az azonosítását úgy végeztük, hogy az említett, 100 kD mőtömegű *E. tenella* protein egy fragmense ellen antiszérumot készítettünk egérben, és ennek az antiszérumnak az antitestjeit Western blot-analízisben alkalmaztuk *E. maxima* és *E. acervulina* sporozoiták esetén, amint ezt az 5. ábra szemlélteti. Úgy találtuk, hogy azoknak a fehérjéknek, amelyek ilyen módon detektálhatók, a molekulatömege hasonló az *E. tenella* Etp100 proteinjeinek molekulatömegéhez. Ugyanez az antiszérum alkalmazható az említett *E. maxima* és *E. acervulina* proteinek immunkromatográfiás elválasztásához.

Az *E. tenella* proteint vagy annak polipeptidfragmenseit kódoló DNS-szekvenciákat a példákban leírt módon *E. tenella* mRNS-ből származtatott komplementer DNS-ből (cDNS) és genomális DNS-ből állítottuk elő. Ezek a DNS-szekvenciák (valamint ezek szubszekvenciái), ezen DNS-szekvenciák és szubszekvenciák által kódolt *Eimeria* antigenitással rendelkező polipeptidekkel együtt szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

Ismeretes, hogy egy adott aminosavat különböző kodonok (nukleotidbázisok trilettjei) kódolhatnak a DNS-ben. Így például a glutaminsav kodonja a GAT vagy GAA stb. Nyilvánvaló, hogy a 6–8. ábrán bemutatott aminosavszekvenciával rendelkező polipeptid (vagy annak polipeptidfragmense) expressziójához hasonló, alternatív kodon-összetételű DNS is alkalmazható.

Emellett az ezen polipeptidek fragmensei, amelyek baromfik coccidiosis elleni immunizálására alkalmazhatók, szintén a találmány tárgyát képezik.

Különböző módszerek ismeretesek az ilyen alkalmazható polipeptidfragmensek (epitópok) kimutatására ismert vagy nem ismert aminosavszekvencián belül. Egy ismert aminosavszekvencia alapján ezek az epitópok kísérleti úton átvizsgáló módszerekkel meghatározhatók, mint amelyeket például a WO 84/03564 és a WO 86/06487 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentések ismertetnek.

Emellett a polipeptid számos, az említett aminosavszekvenciával rendelkező területen epitópként jelölhető meg elméleti megfontolások alapján, és a jelenleg ismeretes epitópokkal való strukturális megegyezés alapján. Ezen területek meghatározását a J. P. Hopp és K. R. Woods szerinti (PNAS USA, 78., 3824–3828., 1981) és a P. Y. Chou és G. D. Fasman szerinti (Advances in Enzymology, 47., 45–148., 1987) másodlagos strukturális szempontok kombinációja alapján határoztuk meg.

Ennek megfelelően az ISPQKPGSPPCPTCEAPRGRSCAEQPPGLTR és a PVDEVVGDWEDWGQCSEQCGGKRRTRNRGPS szekvenciával rendelkező aminosavak, valamint az ezeket a szekvenciákat tartal-

mazó polipeptidek szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

T-sejt epitópok, amelyek szükségesek lehetnek, hasonlóképpen elméleti alapon levezethetők a Berzofsky-féle amfifilitási kritériumok alapján (Science, 235., 1059–62., 1987).

A találmány értelmében coccidiosis elleni immunizálásra alkalmazhatók továbbá például az antiidiotípusos antitestek vagy azok antigénmegkötő fragmensei. Az ilyen antitestek azon antitestek idiotípusa ellen képződnek, amelyek viszont a találmány szerinti polipeptid ellen képződnek. A találmány szerinti polipeptid immunogén ekvivalensei alatt többek között az ilyen típusú antiidiotípusos antitestet értjük.

A találmány értelmében baromfik coccidiosis elleni immunizálása elérhető például úgy, hogy a polipeptidet vagy annak fragmensét vagy immunogén ekvivalensét adagoljuk az állatoknak, vagy elérhető úgy, hogy az immunizálandó állatoknak olyan mikroorganizmust adagolunk, amelyet rekombináns DNS-sel vagy RNS-sel genetikailag módosítottunk, és amely képes a polipeptidet vagy annak immunogén szekcióját vagy ekvivalensét in situ termelni. Az első esetet „alegységvakcinának”, míg a második esetet „vektorvakcinának” nevezik. A továbbiakban mi is alkalmazzuk ezt a nomenclatúrát.

A találmány szerinti eljárással előállított alegységvakcinák általában polipeptideket tartalmaznak tisztított formában, adott esetben farmakológiailag elfogadható hordozó jelenlétében.

Az ilyen célra alkalmazott polipeptidek ismert módon állíthatók elő, például *Eimeriá*ból történő izolálással, rekombináns DNS-technikával vagy peptidszintézissel.

A polipeptid adott esetben egy nem rokon proteinhoz lehet kötve kovalensen, amely például a fúziós termék tisztításánál lehet előnyös. Ilyenek például a β -galaktozidáz, protein-A, prokimozin, Xa véralvadásfaktor stb.

Kívánt esetben a polipeptidek in vivo vagy in vitro módosíthatók, például glikozilezéssel, amidálással, karboxilezéssel vagy foszforilezéssel.

Az immunogenitás fokozására ezeket a polipeptideket hordozóhoz kapcsolhatjuk vagy asszociálhatjuk, és/vagy adjuváns tulajdonságokkal rendelkező vegyületekkel kombinálhatjuk. Továbbá az ezeket a polipeptideket tartalmazó vakcinák más, a vakcinakészítésben szokásos vegyületeket is tartalmazhatnak, mint például stabilizálószerket, puffereket stb.

Vektorvakcinák esetén a találmány szerinti polipeptidterméket genetikailag manipulált szervezetek készítik, amelyeket magukat adagolunk az immunizálandó egyednek, és amelyek bizonyos ideig fenntartják magukat, sőt reprodukálódnak a testben. Ilyen célra gazdaként különböző szervezetek alkalmazhatók, mint például baktériumok, például *Escherichia coli*, *Bacillus* vagy *Salmonella*, vagy vírusok, például szarvasmarhavagy szárnyashimlővírusok. Ilyen típusú gazdaszervezettel a polipeptid felületi antigénként fejeződik ki. Ilyen összefüggésben az adott polipeptid és OMP pro-

teinek vagy az *Escherichia coli* pilus proteinjei vagy a szerkezet által felismert szignál- és kötőhely-szekvenciák szintetikus formái közötti fúzió képzelhető el. Az is lehetséges, hogy az adott immunogén polipeptid kívánt esetben egy nagyobb egésznek a részeként kerül az immunizálandó állatba. Mindezen esetekben az is lehetséges, hogy egy vagy több immunogén termék fejlődik ki, amelyek különböző patogének és/vagy az adott patogén különböző antigénjei ellen alakítanak ki védettséget.

A következőkben ismertetjük az ábrákat.

1. ábra

E. tenella sporozoiták és második generációs merozoiták monoklonális antitestekkel végzett Western blot-analízis mintája

- A) Sporozoiták E. TEN 10Y-2-vel (1. sáv), illetve E. TEN 11P-2-vel vizsgálva (2. sáv)
 B) Merozoiták E. TEN 10Y-2-vel (1. sáv), illetve E. TEN 11P-2-vel vizsgálva (2. sáv)

2. ábra

Etp100 kifejezése (nyíl) különböző spórázási fázisban. A különböző fázisok SDS-PAGE útján elválasztott anyaga Western blot-analízisben vizsgálva hiperimmun csirkeszérummal

1. sáv: spórázott oociszták
 2. sáv: sporociszták
 3. sáv: sporozoiták

3. ábra

E. tenella sporocisztákból származó Etp100 (nyíl) immunaffinitás tisztítása E. TEN 11P-2, illetve E. TEN 10Y-2 monoklonális antitestek felhasználásával

- A) Glicin/HCl (pH=2,6) ezüsttel festett SDS-PAGE-mintája
 1. sáv: E. TEN 10Y-2 oszlopról eluálva
 2. sáv: E. TEN 11P-2 oszlopról eluálva
 3. sáv: kiindulóanyag
 B) Kiindulóanyag és a pH=2,6 eluált frakciók poliklonális nyúl anti-sporozoiták szérummal végzett Western blot-analízise
 1. sáv: kiindulóanyag
 2. sáv: E. TEN 11P-2 oszlopról eluálva
 3. sáv: E. TEN 10Y-2 oszlopról eluálva

4. ábra

Az EtHL6 antigénnek megfelelő natív proteinek azonosítása

A) EtHL6 rekombináns bakteriofág (1. és 5. sáv) és λ amp3 (negatív kontroll; 2. és 6. sáv) által képzett plakokból származó proteinnel kiválasztott antitestek, immun csirkék széruma (3. és 7. sáv) és normál csirkék széruma (4. és 8. sáv) antitestjeit alkalmaztuk E. tenella sporozoiták (spz) és merozoiták (Mz) proteinekből származó proteinek Western blot-analízisében.

B) EtHL6 fúziós protein elleni antiszérum

Egér anti-EtHL6 fúziós proteint (1. és 7. sáv), nyúl anti-EtHL6 fúziós proteint (2. és 8. sáv), az SDS-PAGE-gélen az EtHL6 fúziós proteinnel azonos te-

rületen vándorló, λ amp3 lizogén által termelt proteinek elleni nyúlantiszérumot (negatív kontroll; 3. és 9. sáv), normál nyúlantiszérumot (4. és 10. sáv), immun csirkeszérumot (5. sáv), normál csirkeszérumot (6. sáv) és E. tenella sporozoiták elleni nyúlantiszérumot (11. sáv) használtunk E. tenella sporozoiták (Spz), illetve merozoiták (Mz) proteineiből redukált proteinek Western blot-analízisére.

Az egyszerű nyílak a 110 és 102 kD polipeptid-duplett helyzetét jelölik; egy harmadik, 94 kD polipeptid helyzetét a kettős nyíl jelöli (részleteket lásd a szövegben). Molekulatömeg-markerként miozint, 200 kD; foszforilázt, 92 kD; szarvasmarha-szérumalbumint, 67 kD; ovalbumint, 45 kD; szén-anhidrázt 28 kD és mioglobint, 19 kD használtunk.

5. ábra

EtHL6 antigénnel megfelelő heterológ fajok natív polipeptidjeinek detektálása

EtHL6 fúziós protein elleni egérantiszérumot (1., 3. és 5. sáv) és az SDS-PAGE-gélen az EtHL6 fúziós proteinnel azonos területen vándorló, λ amp3 lizogén által termelt proteinek reagáltattuk Western blot-analízisben E. tenella (1. és 2. sáv), E. maxima (3. és 4. sáv) és E. acervulina (5. és 6. sáv) sporozoitákból redukált proteinekkel. A molekulatömeg-markerek helyzetét jelöltük.

6. ábra

E. tenella genomiális DNS (Etp100) nukleotidszekvenciája, amely az 1-5990. nukleotidig terjed. Az EtHL6 genomiális inszertje megfelel a 2359-3080. nukleotidoknak. A bemutatott transzlatált aminosavszekvencia az Etp100-ból megjósolt. Három genomiális intront jelöltünk vonalkázott területekkel, és az Etp100 5'- és 3'-végeit pontokkal jelöltük.

7. ábra

Az EtHL6 és az EtHL6-tal rokon genomiális és cDNS-szekvenciák sematikus csoportosítása

Az 5'- és 3'-végeket ponttal jelöltük. A 3 genomiális intront szaggatott vonallal jelöltük.

8. ábra

Az Etp100 megjósolt aminosavszekvenciája és az aminosavtartalom statisztikus analízise

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal szemléltetjük közelebbről, a korlátozás szándéka nélkül.

A példákban a következő rövidítéseket használtuk:

OMP: külső membránproteinek

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat

IFA: immunfluoreszcens vizsgálati módszer

NFMP: sovány tejpor

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

MMLV: Moloney-egérleukémiavírus

X-gal: 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

IPTG: izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid

BSA: szarvasmarha-szérumalbumin

CEF: csirkeembrió-fibroblaszt

1. példa

Hibridómák készítése

Paraziták és azok frakcióinak készítése

E. tenella parazitákat fenntartottunk, és oocisztákat izoláltunk Long és munkatársai módszerével (Fol. Vet. Lat. 6., 201–217., 1976). Sporozoitákat izoláltunk és tisztítottunk Wisner és Rose módszerével (Parasitology, 88., 515–519., 1984), és tovább tisztítottunk Larsen és munkatársai nejlonygapotmódszerével (J. Parasitol., 70., 597–601., 1984). Második generációs merozoitákat izoláltunk csirkeklóákából 96 órával a fertőzés után Stotish és Wang módszerével (J. Parasitol., 61., 700–703., 1975), és folyamatos 70%-os Percoll gradiensen végzett centrifugálással tovább tisztítottunk.

Immunizálás és sejfúzió

Balb/C egereket intraperitoneálisan immunizáltunk 10^6 E. tenella sporozoitával 0,5 ml PBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldat), majd ugyanilyen dózissal ugyanilyen módon provokálóinjekciót kaptak 4 nappal a fúzió előtt. 6 héttel az első immunizálás után aseptikusan kiemeltük a lépeket, és a sejteket P3X63Ag 8.6.53. mielóma-sejtvonalal [ATCC TIB9; kereskedelmileg hozzáférhető: Flow Labs (Irvin, Nagy-Britannia)] fuzionáltattuk Köhler és Milstein módszerével (Nature, 256., 495–7., 1975), és standard módszerrel tenyésztettük.

Hibridómák kiválasztása

Sporozitaantigének felismeréséhez hibridómákat választottunk ki immunofluoreszcens módszerrel (IFA). A sporozoitákat PBS-ben szuszpendáltuk ($1-3 \times 10^6$ /ml), és 3 μ l-t cseppentettünk egy 10 nyílásos üveg tárgylemezre (Celline), egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottuk és szárazon tároltuk -70°C -on. Felengedetés után a tárgylemezeket acetonnal fixáltuk, majd minden nyílásba 25 μ l hibridóma-felülszót cseppentettünk, és 37°C -on 30 percig inkubáltuk. A lemezeket PBS-vel leöblítettük és háromszor 5 percig PBS-vel mostuk.

1:(100–200) hígítású jelzett nyúl anti-egér FITC-vel konjugáltuk (Nordic; fluor-izotiocianát), és 30 percig 37°C -on 0,05% Evans-kék jelenlétében inkubáltuk. Ezután a lemezeket mostuk és öblítettük, majd 0,1 mol/l-es Tris-HCl-dal (pH=9,0) és 75%-os glicerinnel kezeltük, majd Leitz Ortholux fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A vizsgálatban pozitívnak mutatózó hibridómákat határhígítással tovább klónoztuk, újra vizsgáltuk és folyékony nitrogénben tároltuk vagy közvetlenül injektáltuk prisztánnal előkészített Balb/C egereknek ascitesztermeléshez ($2,5 \times 10^6$ hibridóma-sejt egereként, ip.). Ezekből a pozitív hibridóma-kból két klónt választottunk ki, amelyek hasznos antitestet termeltek. Ezeket a monoklonantitesteket E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 jellel láttuk el, ezek felismerik az E. tenella sporozoitákat, valamint a második generációs merozoitákat IFA-ban. A két fluoreszcens mintázat hasonló volt. Mindkét monoklonális antitest kötődött ahhoz az anyaghoz, amely a zoiták megelőző felében jelen volt, valószínűleg egy citoplazmatikus proteinhez.

Minták deponálása

Ezeket az E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 antitesteket termelő hibridóma-sejtvonalakat 1989. február 2-án

89020202 és 89020201 számon letétbe helyeztük az European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Nagy-Britannia intézetnél.

2. példa

E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 monoklonális antitestek jellemzése

A) Módszerek

E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 monoklonális antitestek célzott antigénjeit SDS–PAGE/immunblotting módszerrel Vermeulen és munkatársai szerint jellemeztük (J. Exp. Med., 162., 1460–76., 1985). Röviden, 2×10^7 frissen kiszabadult, nejlonygapoton tisztított sporozoitát Laemmli-mintapufferben (Nature, 227., 680–4., 1970) szolubilizáltunk redukálószer, mint például DTT vagy β -merkaptó-etanol adagolása nélkül. 5 percig forraltunk, 3 percig 18 000 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk, glicerinnel 20%-osra állítottuk be és 7–18% akrilamid gradiens géltre (vagy egy egyenesen 12%-os géltre) töltöttük, amely egy 4%-os töltőgél tartalmazott.

Elektroforetikus elválasztás után a proteineket nitrocellulóz-papírra vittük (0,45 μ m; Schleicher és Schüll) a következő összetételű oldatban: 0,01 mol/l Tris, 0,079 mol/l glicin, pH=8,3, 10 V/cm térerőnél 1 óra hosszat.

Az immundetektáláshoz a nitro-cellulóz-lapokat 0,2% sovány tejport (NFMP) tartalmazó PBS-ben előkezeltük 30 percig, majd 90 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk tízszeresen hígított hibridóma-felülszóval PBS-ben, amely 0,05% Tween–20-at és 0,1% NFMP-t tartalmazott, majd alaposan mostuk és alkalikus foszfáttal jelzett anti-egér Ig-vel inkubáltuk. A megkötött Ig-konjugátumokat 0,33 mg/ml nitrokék-tetrazóliummal és 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát-p-toluidin-sóval (0,17 mg/ml) vizualizáltuk a következő összetételű oldatban: 100 mmol/l Tris-HCl, pH=9,5; 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl_2 .

B) Eredmények

A nem redukált E. tenella sporozita-merozozita proteinek alapoló Western blot-analízisben az E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 monoklonális antitestek a 95–110 kD foltokkal reagáltak (1. ábra). Referenciaként bio-rad SDS–PAGE molekulatömeg-markereket használtunk. Az ELISA-mérésben specifikus antiszérumokat alkalmazva az E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 IgG izotípusnak bizonyult.

3. példa

E. TEN 11P–2 monoklonális antitesttel reaktív antigén kifejezése a parazita kifejlődése során

A) Módszerek

Western blot-mintákat készítettünk, amelyek spórázott oociszták, tisztított sporociszták és tisztított sporozoiták összehasonlítható mennyiségét tartalmazó sávokból álltak. A mintákat monoklonális antitestekkel, valamint a (3A. példa szerinti eljárással előállított) csirke-hiperimmunszérummal vizsgáltuk.

A hiperimmun csirkeszérumot úgy készítettük, hogy 9 héthetes csirkének négy napon belül két adag 3×10^4

élő E. tenella oocisztát, majd négy napos időközökben négy adag 10^4 élő E. tenella oocisztát adagoltunk. Az utolsó adag után egy héttel a csirkéket elvéreztettük. A szérumot összegyűjtöttük, és az antisporozoitatitert az 1. példában ismertetett módon immunfluoreszcens vizsgálattal meghatároztuk, amely 1 : 1280 értéknek adódott.

B) Eredmények

Látható volt, hogy a 95–110 kD proteinek, amelyek az E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 monoklonális antitestek által megcélzott proteinek, a sporázott oocisztában már jelen vannak, és a sporociszta- és sporozoitafázisban szintén kifejeződnek. A 95–110 kD proteinek a hiperimmun csirkeszérum többnyire felismerte (2. ábra).

4. példa

E. tenella protein immunkromatográfiás tisztítása Immunaftinitás-oszlopok készítése

E. TEN 11P–2 IgG-jét aszcitesz folyadékból csaptuk ki ammónium-szulfáttal 50%-ig történő telítéssel, szobahőmérsékleten. Az elegyet 30 percig 2500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk egy Minifuge T centrifugával (Heraeus Christ gyártmány). Az üledéket 50%-os ammónium-szulfáttal kétszer mostuk, majd fele térfogatú, 0,2 mol/l-es nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal újra szuszpendáltuk, egy Sephadex G25 oszlopon (Pharmacia PD10) és cian-bromiddal aktivált Sepharose oszlopon (Pharmacia) egy éjszakán át 4°C -on sóalanítottuk. A kötési arány 6,7 mg IgG a gél ml-jeire számítva. E. TEN 10Y–2 IgG-je esetén az aszcitesz folyadék koncentrációját és tisztított protein A Sepharose (Pharmacia) felhasználásával, a gyártó utasításai alapján végeztük. Semlegesítés és sóalanítás után a kapcsolást a fenti módon végeztük, a végső kötési arány 4,8 mg/ml gél volt.

5–7 ml IgG-vel kapcsolt Sepharose-t alkalmas oszlopba öntöttünk és futtatópufferrel kiegyenlítettünk (25 mmol/l Tris-HCl, pH=8,0; 0,5 mol/l NaCl, 0,1% NP40).

Etp100 immunaktivitás tisztítása

-70°C -on fagyasztott 320×10^6 E. tenella sporocisztát felengedettünk és szuszpendáltunk a következő összetételű oldatban: 3 ml 25 mol/l Tris-HCl, pH=8,0; 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l PMSF.

A tisztát 3 g, körülbelül 0,3 mm átmérőjű üveggyöngy jelenlétében forgatva összetörtük. Az oldatot Nonidet P40 (NP40)-re nézve 0,1%-osra állítottuk be és 0°C -on egy óra hosszat inkubáltuk. Az oldhatatlan anyagot 4°C -on 15 percig 2000 fordulat/perc sebességgel, majd 1 óra hosszat 3000 fordulat/perc sebességgel centrifugálva elválasztottuk. A felülúszót átengedtük egy 0,22 μm pórusméretű szűrőn, majd felvittük az immunoszlopra.

5 ml E. tenella sporocisztaextraktumot kötöttünk meg E. TEN 11P–2 és E. TEN 10Y–2 oszlopokon 0,15 ml/perc átfolyási sebességgel, recirkulációs rendszerben, egy éjszakán át szobahőmérsékleten.

Körülbelül húsz cirkulátatás után a nem kötött frakciót felfogtuk, és félretettük további analízisre. Az oszlopokat 0,5 ml/perc átfolyási sebességgel legalább há-

romszor mostuk felváltva Wash 4 (0,1 mol/l acetát, 0,5 mol/l NaCl, 0,1% NP40, pH=4,0) és Wash 8 oldattal (0,1 mol/l Tris-HCl, 0,5 mol/l NaCl, 0,1% NP40, pH=8,0).

5 Kétszeres töltetfogatnyi futtatópufferrel végzett mosás után az alkalikus eluálást a következő oldattal végeztük: 4 ml 0,1 mol/l karbonát/bikarbonát, pH=10,6, 0,1% NP40.

10 A frakciókat 1 mol/l-es Tris-oldattal (pH=8,0) semlegesítettük, és az oszlopot futtatópufferrel újra kiegyenlítettük. Az ez utáni eluálást a következő összetételű oldattal végeztük: 0,1 mol/l glicin/HCl, 0,15 mol/l NaCl, 0,1% NP40, pH=2,6. A savas frakciókat 1 mol/l-es Tris-oldattal (pH=8,0) semlegesítettük.

15 A frakciókat SDS-PAGE segítségével nemredukáló körülmények között és Western blot-analízissel vizsgáltuk, amely utóbbiban poliklonális nyúl anti-sporozoita szérumot használtunk vizsgálóantitestként (3. ábra). Mindkét oszlopról savas körülmények között eluáltuk a főfrakciót. Az E. TEN 11P–2 oszlopról eluált anyag pozitívan reagált az E. TEN 10Y–2 monoklonális antesttel.

5. példa

E. tenella cDNS-könyvtár készítése és immunológiai átvizsgálása

A) RNS izolálása

30 Az RNS izolálásához teljesen sporázott oocisztákat 2,8 ml pufferrel felvettük, amelynek összetétele 10 mmol/l Tris-acetát (pH=7,6), 75 mmol/l nátrium-acetát, 1% SDS, 2 mmol/l EDTA, 0,2 mg/ml proteináz-K és 10 mmol/l vanadil-ribonukleozid-kompleksek. Az oocisztákat 13 g, 0,5 mm átmérőjű üveggyöngy jelenlétében 50 másodpercig végzett keveréssel szétzúztuk. Ezután hozzáadtunk 5 ml fenolt, és az elegyet további 60 másodpercig erőteljesen kevertük. Centrifugálás után a felülúszót lepítettztük és újra extraháltuk fenol, kloroform és izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú, azonos térfogatú mennyiségével. Az RNS-t 2,5 térfogatnyi etanollal kicsaptuk, a kapott csapadékot 800 μl , 10 mmol/l Tris és 0,1 mmol/l EDTA-t tartalmazó oldattal (pH=7,6) feloldottuk, majd a terméket azonos térfogatú, fenol, kloroform és izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú elegyével kétszer és kloroform és izoamil-alkohol 24:1 térfogatarányú elegyével kétszer extraháltuk, majd etanollal kicsaptuk. A poliA⁺-RNS-t oligo(dT)-cellulóz-kromatográfiával izoláltuk (Maniatis és munkatársai, idézett helyen). 5×10^8 oocisztából körülbelül 100 μg poliA⁺-RNS-t izoláltunk.

B) cDNS szintézise

55 A poliA⁺-RNS-t cDNS-sé alakítottuk MMLV reverz transzkriptáz segítségével. Ehhez 25 μg poliA⁺-RNS-t feloldottunk 90 μl vízben, és 5 percig 20°C -on mercuri-metil-hidroxid 10 mmol/l koncentrációig történő adagolásával denaturáltuk, majd az elegyhez β -merkapto-etanolt adagoltunk 45 mmol/l koncentrációig, és az elegyet további 3 percig 20°C -on inkubáltuk. Az enzimreakciót 190 μl pufferoldatban hajtottuk végre, 60 amelynek összetétele 4 μg oligo(dT)₁₅, 150 egység

RNSSin^(R), 20 mmol/l Tris (pH=7,6), 30 mmol/l KCl, 4 mmol/l ditioneitol (DTT), 2 mmol/l MgCl₂, 1-1 mmol/l dNTP és 3000 egység MMLV reverz transzkriptáz. A reakcióelegyet 1 óra hosszat 37 °C-on inkubáltuk, majd 10 µl 0,5 mol/l-es EDTA-val leállítottuk a reakciót. Ezután azonos térfogatú fenol, kloroform és izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú elegyével extraháltuk, és az RNS/DNS hibridet ammónium-acetát 2 mol/l koncentrációig történő adagolásával és 2,5-szeres térfogatú etanollal kicsaptuk. A második szál szintézisét DNS-polimeráz I és RN-áz H kombinációjával végeztük. Az előbbi csapadékot 960 µl pufferben oldottuk, amelynek összetétele 20 mmol/l Tris (pH=7,6), 5 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 0,6 mmol/l β-NAD, 16 egység RN-áz H, 200 egység DNS-polimeráz I és 20 egység DNS-ligáz (E. coli). Az inkubálást 12 °C-on egy óra hosszat, majd 22 °C-on egy óra hosszat végeztük, ezután a reakciót azonos térfogatú fenol, kloroform és izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú elegyével leállítottuk és etanollal kicsaptuk.

Mielőtt a cDNS-t egy alkalmas vektorba klónoztuk, előbb azt módosítottuk. 5 µg cDNS-t feloldottunk 100 µl pufferben, amelynek összetétele 30 mmol/l nátrium-acetát (pH=5,6), 50 mmol/l NaCl, 1 mmol/l ZnSO₄ és 21 egység Mung babnukleáz. A reakcióelegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd a reakciót EDTA 10 mmol/l koncentrációig és Tris 25 mmol/l koncentrációig történő adagolásával leállítottuk. Extrakciót végeztünk fenol, kloroform és izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú elegyével, és az elegyet Sephadex G50 oszlopon sómentesítettük.

125 µl eluátumhoz a következő anyagokat adtuk: Tris (pH=7,6) 50 mmol/l-ig, EDTA 2,5 mmol/l-ig, DTT 5 mmol/l-ig, S⁻-adenozil-metionin 0,5 mmol/l-ig és 100 egység EcoRI-metiláz. Az elegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 15 percig 65 °C-ra melegítve a reakciót leállítottuk, ezután 1/10 térfogatnyi, következő összetételű oldatot adtunk hozzá: Tris-HCl 100 mmol/l, MgCl₂ 100 mmol/l és NaCl 500 mmol/l (pH=7,5), ugyanakkor hozzáadtunk 1-1 mmol/l dNTP-t és 12,5 egység Klenow DNS-polimerázt. A reakciót azonos térfogatú fenol, kloroform, izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú elegy adagolásával leállítottuk, miután 22 °C-on 60 percig inkubáltuk. A felülúszó-folyadékban lévő nukleinsavakat 350 µl víz, 50 µl 3 mol/l-es nátrium-acetát (pH=5,6) és 500 µl izopropanol adagolásával kicsaptuk. A csapadékot 100 µl vízben feloldottuk, és Sephadex G50 oszlopon sómentesítettük, az eluátumot etanollal kicsaptuk.

A csapadékot 24 µl vízben feloldottuk, és a ligálást 50 µl térfogatban hajtottuk végre, amelyhez a következő anyagokat adtuk: 2 µg EcoRI linker, Tris-HCl (pH=8,0) 30 mmol/l-ig, MgCl₂ 10 mmol/l-ig, ditioneitol 10 mmol/l-ig, ATP 1 mmol/l-ig, zselatin 0,1 mg/ml-ig és 10 egység T₄ DNS-ligáz. A reakcióelegyet 16 óra hosszat 4 °C-on inkubáltuk, majd 15 percig 70 °C-on melegítve a reakciót leállítottuk. Ezután EcoRI endonukleázzal hasítottunk 210 µl pufferben, amelynek összetétele: 100 mmol/l Tris-HCl (pH=7,6), 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl₂, 2,5 mmol/l DTT és 500 egy-

ség EcoRI. A reakcióelegyet 37 °C-on 90 percig inkubáltuk, majd a reakciót azonos térfogatú fenol, kloroform, izoamil-alkohol 25:24:1 térfogatarányú elegyvel történő extrakcióval leállítottuk. A felülúszó-folyadékban jelen lévő nukleinsavakat 2,5-szeres térfogatú etanollal kicsaptuk, majd nátrium-acetátot (pH=5,6) adtunk hozzá 300 mmol/l koncentrációig, majd a cDNS-t és a linkereket Biogel A15m oszlopon elválasztottuk. A cDNS-t etanollal kicsaptuk, majd a csapadékot 10 mmol/l Tris-HCl-ot és 0,1 mmol/l EDTA-t tartalmazó oldattal (pH=7,6) feloldottuk. A cDNS-molekulákat ezután λgt11 és λgt10 fágba klónoztuk (Huynh és munkatársai, DNA cloning techniques: A Practical Approach, 1984).

5 C) λgt11 cDNS-könyvtár átvizsgálása E. TEN 11P-2 monoklonális antitesttel

λgt11 cDNS-klónokkal fertőzött E. coli Y1090⁻ által termelt proteinek nitro-cellulóz-szűrőkön immobilizáltunk Huynh és munkatársai által az idézett helyen ismertetett módon. A cDNS-könyvtárat E. TEN 11P-2 monoklonális antitesttel vizsgáltuk át, és így 2×10⁵ fágklónban körülbelül egy pozitív reakciót kaptunk. A monoklonális antitesteket protein A Sepharose oszlopon tisztítottuk, és azonos térfogatú, 0,05% Tween-20-at és 100% FCS-t tartalmazó Tris-pufferrel hígítottuk (10 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, pH=8,0). A szűrőket 25 °C-on két óra hosszat inkubáltuk. Ezután 4×10 percig mostuk 50 ml, 0,05% Tween-20-at tartalmazó fenti Tris-pufferrel. Ezután 30 percig 37 °C-on inkubáltuk egy kecske-anti-egér antitest és alkalikus foszfatáz konjugátumával (1:7500 arányban hígítva 0,05 Tween-20-at és 10% FCS-t tartalmazó fenti Tris-pufferrel), majd a szűrőket az előbbi módon mostuk. A megkötött alkalikus foszfatázt 30 percig szobahőmérsékleten a következő összetételű oldatban végzett inkubálás után detektáltuk: 100 mmol/l Tris-HCl, 100 mmol/l NaCl, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl₂, pH=9,6, 0,33 g/l nitrokék-tetrazólium és 0,17 g/l 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát.

40 Egy, az immunvizsgálatban pozitívnak mutatózó klónt plakktisztításnak vetettünk alá, és ezt a klónt Et100 jellel jelöltük (lásd 7. ábra).

6. példa

45 E. tenella genomális könyvtár készítése és immunológiai átvizsgálása

A) Módszerek

E. coli törzsek

50 E. coli Y1088 [supE supF strA metB trpR hsdR hsdMtonA21 ΔlacU169 (proC::Tn5) (pMC9)] (ATCC 37195), Y1089 [ΔlacU169 proA⁺ Δlon araD139 strA hfla150 (chr::Tn10) (pMC9)] (ATCC 37196) és Y1090 [ΔlacU169 proA⁺ Δlon araD139 strA supF (trpC22::Tn10) (pMC9)] (ATCC 37197) az American Type Culture Collection Intézetétől.

DNS izolálása

50 E. tenella kromoszomális DNS, csirke-DNS és E. coli-DNS izolálását Clarke és munkatársai: Mol. Biochem. Parasitol., 22., 79-87., 1987 helyen ismertetett módon végeztük.

Genomiális könyvtár készítése

E. tenella DNS-t részben emésztettünk EcoRI-vel (Bethesda Research Laboratories) és EcoRI-vel emésztett borjú-intesztinálisfoszfáttal (Boehringer Mannheim) kezelt λ mp3-mal ligáltuk T_4 DNS-ligáz segítségével (Boehringer Mannheim) 4 °C-on 16 óra hosszat. 1 μ g DNS-hez a végső ligálási térfogat 10 μ l volt, és a vektor és inszert aránya 4:1 volt. A λ mp3-at Kemp és munkatársai fejlesztették ki λ gt11-ből (P. N. A. S. USA, 80: 3787, 1983). A fágot in vitro pakoltuk (Maniatis és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 1982), E. coli Y1088 törzssel inkubáltuk és X-gal (5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) és IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) jelenlétében szélesztettük. Ezt a könyvtárat amplifikáltuk (Maniatis és munkatársai, idézett helyen) és meghatároztuk a titerét az átvizsgálás előtt.

Genomiális könyvtár immunológiai átvizsgálása és antiszérum készítése

Az eljárást Clarke és munkatársai idézett helyen ismertetett módszerével végeztük.

B) Eredmények

Az EtHL6 rekombináns bakteriofág egy E. tenella DNS 722 bp hosszúságú EcoRI restrikciós fragmenst tartalmaz. Lásd a 7. ábrát is. Az EtHL6 által képzett plakkok antitestpozitívnak bizonyultak a genomiális DNS-könyvtár immun csirkeszérummal végzett átvizsgálása után.

7. példa

EtHL6 fúziós protein jellemzése

A) Módszerek

Antitestaffinitás elválasztása

1×10^4 EtHL6 bakteriofágot 9 cm átmérőjű edényekben szélesztettünk E. coli Y1090 törzsen, és 42 °C-on három óra hosszat inkubáltuk. Egy előzetesen IPTG-vel kezelt szűrő mindkét oldalát 37 °C-on két óra hosszat érintkeztettük a lemez felületével. A szűrőket szobahőmérsékleten egy óra hosszat inkubáltuk immun csirkeszérummal (E. coli-val preabszorbeálva és 1:20 arányban hígítva 1% BSA-t tartalmazó PBS-vel, pH=7,0). Mosás után a megkötött antitestet 5 ml 0,2 mol/l-es glicinnel eluáltuk (pH=2,8) 10 percig, majd semlegesítettük 650 μ l következő összetételű oldattal: 2 mol/l Tris (80 μ l), 10 \times PBS (500 μ l), 2 mg/ml klóramfenikol (50 μ l) és 0,25 g BSA. A kiválasztott antitestet használtuk további hígítás nélkül a sporozoit- és merozoita-proteinek Western blot-vizsgálására.

Fúziós proteinek

E. coli Y1089 törzset lizogénizáltunk a 6B. példában ismertetett fággal, és lizátumot készítettünk 1 ml log-fázisú tenyészetből (Coppel és munkatársai, Nature, 306: 751–756., 1983).

Poliakrilamidgél-elektroforézis (PAGE)

A mosott sporozoitáüledéket vagy a fág-lizátumot 5 percig forralva feloldottuk a következő összetételű oldatban: 2 tömeg/térfogat% nátrium-dodecil-szulfát, 6 mol/l karbamid, 5 térfogat% 2-merkaptó-etanol, 0,49 mol/l Tris-HCl, pH=6,7. Ezután 5 percig mikro-

centrifugában centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz 0,1 tömeg/térfogat% bróm-fenol-kéket tartalmazó 50 térfogat%-os glicerint adtunk. Nem folytonos gélt hoztunk létre, amely 3,6 tömeg/térfogat%-os akrilamid elválasztógélből (pH=6,7) és 6–14 tömeg/térfogat%-os akrilamid gradiens gélből (pH=8,9, 16 \times 0,1 cm) állt. Az elektroforézist 16 óra hosszat 50–70 V állandó feszültséggel végeztük, és a csíkokat a proteinek nézve 0,2 tömeg/térfogat% PAGE-kék 83 festéket (BDH Chemicals) tartalmazó 35 térfogat%-os metanol, 10 térfogat%-os ecetsav-oldattal festettük.

Polipeptid immunfoltvizsgálata

Az SDS-PAGE után a géllapokat 30 percig 500 ml következő összetételű oldatban egyenlítettük ki: 25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glicin, pH=8,3, 20 térfogat% metanol (transzferpuffer). A gélben lévő polipeptideket elektroforetikus úton nitro-cellulóz-papírra (Schleicher és Schull, BA85, 0,45 μ m) vittük át (Towbin és munkatársai, PNAS, 76., 4350–4354., 1979) egy Transblot transzfercellában (Bio-Rad Laboratories). Az elektroforézist transzferpufferben 4 °C-on, 16–22 óra hosszat 30 V egyenletes feszültségnél végeztük. Az átvitel után a sporozoitamintákat tartalmazó nitro-cellulóz-papírt 3 tömeg/térfogat% szarvasmarha-szérumalbumin (BSA; Sigma A4503) tartalmazó PBS-vel blokkoltuk (pH=7,0). Az átvitt markerproteint tartalmazó nitro-cellulóz-csíkokat Indian tintával festettük. A foltokat immun vagy normál csirkeszérummal reagáltattuk (1:200 arányú hígítás a következő összetételű oldattal: 1 tömeg/térfogat% BSA, PBS, pH=7,0, 0,05 térfogat% Tween-20), 1 óra hosszat szobahőmérsékleten. A foltokat ötször 5 percig mostuk 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-vel (pH=7,0), majd 1 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáltuk affinitástisztított nyúl anti-csirke IgG (H+L)-peroxidáz konjugátummal (Zymed Laboratories Inc.; 1:200 arányban hígítva a következő összetételű oldattal: 1 tömeg/térfogat% BSA, PBS, pH=7,0, 0,05% Tween-20). A foltokat ezután újra ötször mostuk a fenti módon. A peroxidázkonjugátum kötését a következő oldattal végzett reakcióval detektáltuk: 0,5 mg/ml diamino-benzidin, 50 mmol/l Tris-HCl, pH=7,4, 200 mmol/l NaCl és 0,03 térfogat% H₂O₂. A reakciót 0,0% Tween-20-at tartalmazó PBS-vel (pH=7,0) végzett mosással állítottuk le.

B) Eredmények

Az EtHL6 által termelt β -galaktozidáz fúziós protein SDS-PAGE és Western blot-analízisével kimutattuk, hogy ez immunszérummal és egér anti- β -galaktozidáz-szérummal reagál. Az Eimeria DNS által kódolt polipeptid méretét 35,5 kD-ben állapítottuk meg (két leolvadás átlaga, az adatok nincsenek megadva).

Az EtHL6 antigénnek megfelelő natív proteint olyan antitestekkel azonosítottuk, amelyeket vagy egekben vagy nyulakban képeztünk poliakrilamid gélcsíkok injektálása útján, amelyek EtHL6 fúziós proteint tartalmaztak, vagy immun csirkeszérumból affinitástisztítással nyertünk. Ezek az antitestek erősen reagáltak a 110,0+1,0 kD polipeptidduplettel (átlag \pm standard hiba, n=12) az E. tenella sporozoitáiból és második generációs merozoitáiból izolált proteinek Western

blot-mintáin (4. ábra, egyszerű nyilak). A 4. ábrán megjelent egy gyengébb reakció (duplafejű nyíl) egy harmadik sporozoitapolipeptiddel, amelynek móltömege $94,0 \pm 1,0$ kD ($n=5$). Egy hasonló polipeptidet azonosítottunk a merozoitákban is.

Az EtHL6 fúziós protein elleni egérantiszérum-polipeptidek kisebb csoportjaival szintén reagált az *E. maxima* és *E. acervulina* sporozoiták proteinjeinek Western blot-mintáin (5. ábra). A polipeptidek molekulatömege hasonló volt, mint az *E. tenella* proteinek Western blot-mintáin találhatóé, azaz 108–92 kD *E. maxima* esetén és 102–95 kD *E. acervulina* esetén.

8. példa

EtHL6-tal rokon DNS-szekvenciák jellemzése

A) Módszerek

DNS analízise

Fágtörzseket hoztunk létre, és DNS-t extraháltunk a lemezlizátumokból. Plazmid- és kozmid-DNS-t tisztítottunk ismert módszerekkel (Maniatis és munkatársai, idézett helyen). 50 $\mu\text{g/ml}$ RN-áz jelenlétében végzett restriktív enzimmukleázos emésztés után a DNS-t agarózgéleken fracionáltuk a következő összetételű oldattal: 40 mmol/l Tris-HCl, 20 mmol/l nátrium-acetát, 0,1 mmol/l EDTA (pH=8,3) (TAE-puffer).

DNS hibridizációi

Genomiális, fág-, kozmid- és plazmid-DNS-t restriktív emésztéssel hasítottunk és 1%-os agarózgélben fracionáltunk, majd Genescreenre (New England Nuclear) vittük át 25 mmol/l-es foszfátpufferben (pH=6,5) Southern módszerrel (J. Mol. Biol., 98., 503–517., 1975). A DNS-minták hibridizációját ^{32}P -vel jelzett nick-transzlációs készlettel (Amersham gyártmány) végeztük a gyártó cég előírásai szerint 37 °C-on 16 óra hosszat a következő összetételű oldatban: egyszer Denhardt-féle oldat, 0,1 tömeg/térfogat% SDS és egyszer SSC. A kolóniahibridizációt Grunstein és Hogness módszerrel végeztük (P. N. A. S. USA, 72., 3961–3965., 1975).

Az EtHL6 klón DNS-inszertjét elektroelúcióval 1%-os agarózgélről tisztítottuk (Maniatis és munkatársai, idézett helyen) a következő összetételű oldattal: 40 mmol/l Tris-HCl, 20 mmol/l nátrium-acetát, 0,1 mmol/l EDTA, pH=8,3.

Az autoradiográfiát –70 °C-on végeztük Dupont intenzifikálóernyőkkel és Fuji RX röntgenfilm segítségével.

E. tenella genomiális DNS kozmidkönyvtárának készítése és átvizsgálása

E. tenella genomiális DNS-t részben emésztettünk MboI-vel, ligáltuk BamHI-kal emésztett pHC79 kozmiddal, és Maniatis és munkatársai idézett helyen ismertett módszerrel pakoltuk. A nem amplifikált könyvtárból körülbelül 500 kolóniát vizsgáltunk át nick-transzlatált, tisztított EtHL6 inszert segítségével. A 7.46 jelű kozmidklónt (Etg100 jelű inszert, lásd a 7. ábrát is) különböző restriktív endonukleázokkal emésztettük, a fragmenseket agarózgélben elválasztottuk, Southern blot-módszerrel nitro-cellulózra vittük, és az EtHL6 szekvenciákat tartalmazó restriktív fragmensek azonosítására vizsgáltuk.

E. tenella cDNS-könyvtár átvizsgálása $\lambda\text{gt}10$ fágban

Spórázott *E. tenella* oociszta mRNS cDNS-klónjait $\lambda\text{gt}10$ -ben vizsgáltuk át nick-transzlatált, tisztított EtHL6 inszert segítségével a fenti módon. Huszonegy pozitív fágot találtunk. Ezek közül egyet (cDNS 10 – Etc100 jelű inszert – lásd a 7. ábrát is) választottunk ki további tanulmányozásra.

Klónok szekvenciameghatározása

Az EtHL6 inszertjeit és az EtHL6-tal rokon klónok (Etc100 és Etg100 kozmid) inszertjeit M13mp, pUC13 és pAT153 plazmidba (kereskedelmileg hozzáférhető: Phabagen Collection, Utrecht) szubklónoztuk. A szekvenciameghatározást didezoximódszerrel végeztük [Bankier és Barrell, Techniques in the Life Sciences (Biochemistry) 85., Techniques in Nucl. Acids. Bioc., 1–34., 1983].

B) Eredmények

Az EtHL6-ból származó DNS fizikai feltérképezése azt mutatta, hogy az EcoRI inszert mérete körülbelül 700 bp, és ez egyetlen HindIII helyet tartalmaz. Nukleotidszekvencia-analízissel a pontos méret 722 bp-nek adódott, és igazolódott a HindIII hely jelenléte közel az inszert egyik végéhez. A leolvasási keretet a $\lambda\text{amp}3$ vektorban jelen lévő EcoRI klónozóhely ismert leolvasási keretere vonatkoztatva meghatároztuk, amely a fúziós protein termelését teszi lehetővé. Az egyetlen meghatározott nagy nyitott leolvasási keret (ORF) olyan orientációjú volt, amely a HindIII helyett az inszertnek a β -galaktozidázgénnel ellentétes részébe helyezte. Az EtHL6 bakteriofág DNS-restriktív feltérképezése megerősítette, hogy valóban ez az aktív orientáció.

Mivel az EtHL6 fragmens nem tartalmazza a teljes gént, egy részlegesen emésztett *E. tenella* genomiális DNS-kozmidkönyvtárat átvizsgáltunk, és a 7.46 rekombináns kozmidot izoláltuk. Ennek a kozmidnak a különböző restriktív enzimekkel végzett emésztéssel kapott fragmenseit Southern blot-elemzésnek vetettük alá, így két HindIII fragmenst találtunk, amelyeknek hossza körülbelül 3 kb és 1,3 kb, amelyek hibridizáltak a mintához. Egy további 1,7 kb hosszúságú HindIII fragmenst azonosítottunk, amely 3'-irányban helyezkedik el az 1,3 kb HindIII fragmenshez képest. A 3 kb hosszúságú HindIII (H3), 1,3 kb hosszúságú HindIII (H3A), 1,35 EcoRI (E5) és az 1,7 kb hosszúságú HindIII (C4) fragmenst pUC13-ba szubklónoztuk, és nukleotidszekvenciájukat meghatároztuk, így 5990 bp hosszúságú összefüggő genomiális szekvenciát kaptunk az EtHL6 fragmenssel, amely a 2359 és 3080 helyzetek között foglal helyet. Ezt a nukleotidszekvenciát mutatja a 6. ábra.

A genomiális szekvencia meghatározása mellett a $\lambda\text{gt}10$ könyvtár egy cDNS-klónjának a szekvenciáját is meghatároztuk, cDNS10 jellel jelöltük és az EtHL6 inszerthez való hibridizálással azonosítottuk. Az inszert 3402 bp hosszúságú és a genomiális szekvencia 688-helyzeténél kezdődik és a 4993-helyzeténél végződik, és három közbenső, nem kódoló területet (intron) tartalmaz, amelyeket a genomiális szekvenciában azonosítottunk. A genomiális szekvencia ezen cDNS-klónpárjainak szekvenciaadatait a 6. ábra szemlélteti. Az

Etc100 3'-végénél van egy további A(17) szekvencia, amely az Etc100 poli-A farkát jelenti.

EtHL6-tal rokon szekvenciák csoportosítása

A 7. ábrán bemutatjuk az EtHL6, Etc100, Etc100 és Et100 sorba rendezését.

Az Etc100 végeinek helyzetét a 6. ábrán ■ jellel megjelöltük, és megadtuk a megjósolt aminosav-szekvenciát és a genomiális intronokat is. Úgy tűnik, hogy az Etc100 nem kódolja a teljes hosszúságot. Az 5'-végeknél van egy egyedülálló terminációs kodon, a 9–11. nukleotidoknál (TAG, a 6. ábra genomiális szekvenciájának 696–698. nukleotidjai), amelyet ugyanazon leolvasási keretben közvetlenül követ a megjósolt kódoló szekvencia, amelynek az első potenciális iniciációs kodonja a 78–80. nukleotidoknál van (ATG, a 6. ábra genomiális szekvenciájának 765–767. nukleotidjai), és megszakítás nélkül folytatódik a 2213. nukleotidig (a 6. ábra genomiális szekvenciájának 3804. nukleotidja), ahol egy, a leolvasási keretben lévő terminációs kodon (TAA) követi. Ezt 1189 bp, nyilvánvalóan nem kódoló szekvencia követi a 3'-terminus előtt.

Az ebből a nyitott leolvasási keretből megjósolt polipeptid egy 712 aminosavhosszúságú, 74,8 kD molekulatömegű polipeptid. A megjósolt aminosav-szekvenciát a 8. ábra mutatja egy, az összetételt mutató táblázattal együtt. Ezt a szekvenciát a lehetséges antitestepitópokra nézve analizáltuk Hopp és Woods (idézett helyen), valamint Chou és Fassman (idézett helyen) algoritmusával, így a következő epitópterületeket kaptuk: 270–300. és 495–525.

9. példa

Et100-at kifejező rekombináns szárnyashimlővírus készítése

A) Plazmid készítése

1 µg p1019 plazmidot, amely tartalmazza a teljes Etc100-at a 3'-vég 362. nukleotidjának kivételével, BamHI és HindIII restriktív enzimekkel vágtuk. Az Etc100 BamHI/HindIII fragmense tartalmazza a pUC13 polilinker BamHI–EcoRI részét az 5' nem kódoló szekvenciától fölfelé, és a megjósolt nyitott leolvasási keretet és végeket a HindIII helynél, a 3' nem kódoló területen belül (4309–4314. helyzetek a 6. ábrán). A restriktív emésztéssel kapott elegyben a végeket 10 egység T₄ DNS-polimerázzal és 10 egység E. coli DNS-polimerázzal (nagyobbik fragmens) helyreállítottuk, majd klónoztuk egy szárnyashimlővírus rekombináns plazmidban a tompa végűvé tett beiktatási helyre. Az Etc100 inszertet tartalmazó plazmidokat tartalmazó baktériumkóloniákat ³²P-vel jelzett Etc100-zal azonosítottuk, és az inszert orientációját a DNS minipreparátum restriktív emésztésével határoztuk meg. Azonosítottunk egy plazmidot, amely az inszertet a szárnyashimlővírus expressziójához helyes orientációban tartalmazta. Az Etc100 szekvencia és a szárnyashimlővírus rekombináns plazmid kapcsolódása szekvenciájának meghatározásához primerként egy olyan oligonukleotidot használtunk, amely komplementer az Etc100 megjósolt nyitott leolvasási kerettel rendelkező területére (788–802. nukleotidok a 6a. ábrán). Ez a szekvenciameghatározás megerősítette,

hogy az Etc100 BamHI/HindIII fragmense szomszédos és korrekt orientációban helyezkedik el a vektor-sárnyashimlővírus transzkripciós promoterével.

B) Rekombinálás szárnyashimlővírusba

5 A plazmidot standard kalcium-foszfátos módszerrel csirkeembrió-fibroblasztba (CEFS) transzfektáltuk, amely fertőzött volt FP9 szárnyashimlővírus-törzzsel. A rekombináns vírusokat izoláltuk és plakktisztítással tisztítottuk háromszor. Egy rekombináns vírust, amelyet E10 szárnyashimlővírus-jellel láttunk el, tovább tanulmányoztunk. Az E10 törzs mintáját úgy állítottuk elő, hogy egyetlen plakkról beoltottunk egy 25 cm² felületű palackot, és a kapott vírusalíkvotokat –20 °C-on tároltuk. Ebből további mintákat úgy állítottunk elő, hogy 20–125 cm² felületű palackot beoltottunk sejtenként 0,1 plak-képző egységgel a törzsmintából. A minták titerét CEF-en plak-képzéssel határoztuk meg standard módszerekkel.

C) Et100 kifejezése szárnyashimlővírus E10-zel

20 25, illetve 125 cm² felületű palackok egybefüggő CEF-rétegét 0,1 pfu/sejt arányban fertőztük E10 szárnyashimlővírussal. A fertőzött sejteket a fertőzés után különböző időkben összegyűjtöttük úgy, hogy foszfáttal pufferolt sóoldatban (pH=7,0) eldörzsöltük és azonos térfogatú, kétszeres Laemmli-puffer adagolásával 25 körülbelül 10⁶ fertőzött sejt lizátumát 5 percig forraltuk, majd 10%-os poliakrilamid géltre vittük fel, és egy éjszakán át 100 V feszültséggel elektroforézisnek vetettük alá. Eredeti szárnyashimlővírussal fertőzött sejtek azonos mennyiségű lizátumait hasonlóképpen kezeltük. A gélekről ismert elektroblot módszerrel nitrocellulóz-másolatot készítettünk, és a nitro-cellulóz-membránokat Eimeria tenella antiszérummal vizsgáltuk. Az E10 lizátumában egy körülbelül 100 kD méretű polipeptid volt felismerhető nyúlantisporozoita és 30 csirkeantiszérummal. Ez a polipeptid nem volt jelen eredeti szárnyashimlővírussal fertőzött sejtek lizátumában. A 100 kD méretű polipeptidet két nappal a fertőzés után detektáltuk, amikor a fertőzést a 0,1 pfu többszörösével végeztük és 7 napig folytattuk, amikor a sejtréteg teljesen elroncsolódott a vírus citopatogén hatására. A polipeptidet (Et100 jellel jelöltük) mind redukáló, mind nem redukáló gélen detektáltuk.

D) E10 szárnyashimlővírust kifejező, Et100-zal végzett vakcinálás

50 I. Háromhetes madarakat (Light Sussex) intravénásan beoltottunk 3 × 10⁷ pfu eredeti szárnyashimlővírussal (I. csoport), illetve E10 rekombináns szárnyashimlővírussal (II. csoport) 500 µl 199 jelű szövetenyésztő tápközegben. A III. csoportot csak 199 jelű (Gibco/Life Technology, katalógusszám: 21155) tápközeggel oltottuk. A madarak öt hetes korban ugyanilyen injekciót kaptak, és a provokálás után 10 nappal az állatokat elvéreztettük. Meghatároztuk a szárnyashimlővírus és az Eimeria tenella összeűzött spórázott oocisztái elleni ELISA-titert. A két vírussal fertőzött csoport madarainak több, mint 90%-ában találtunk szárnyashimlővírus elleni antitesteket 1:64000 titer fölött, míg a kontrollcsoport madarai elhanyagolható titer mutattak. Az Eimeria tenella elleni titer nem emelkedett

szignifikánsan, de az 1:1000 arányú hígításnál az optikaisűrűség-érték enyhén emelkedett az E10 csoportban. Az eredményeket a következőkben foglaljuk össze.

Csoport	Szárnyashimlő-vírus elleni (átlag)	Eimeria tenella elleni (átlag)
I.	0,844	0,126
II.	0,855	0,161
III.	0,016	0,070

Madarak tízes csoportjainak antiszérumat összegyűjtöttük, és elektroforetikus elválasztott Eimeria tenella sporozoiták, illetve második generációs merozoiták proteinjének Western blot-analízisében használtuk. Az E10 rekombináns vírussal oltott madarak antiszéruma 1:1000 arányú hígításban felismerte az Et100 polipeptidet mind a sporozoiták, mind a merozoiták esetén, míg a többi csoport széruma nem.

Egyhetes madarakat a szárnyhártya bekarcolásával beoltottunk 3×10^6 pfu eredeti, illetve rekombináns E10 szárnyashimlővírussal 50 µl 199 jelű szövetenyésztő tápközegben. Egy harmadik csoport madarat csak 199 jelű tápközeggel oltottunk be. Négyhetes korban a madarak egy második oltást kaptak, ekkor azonban 3×10^7 pfu megfelelő vírust szintén 50 µl 199 jelű tápközegben. Ezután négy héttel a madarakat egyhetes időközönként elvértettük, és a szérumot Eimeria tenella sporozoita, illetve második generációs merozoita elektroforetikus elválasztott proteinek Western blot-analízisében alkalmaztuk. A negyedik hétnél nem volt látható reaktivitás, egy héttel később azonban (egy héttel a második oltás után) az E10-zel oltott madarak specifikusan felismerték az Et100-at mind a sporozoitákból, mind a merozoitákból.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás Eimeria tenella immunológiai tulajdonságaival rendelkező protein vagy annak polipeptidfragmense vagy immunogén ekvivalense előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az E. tenella sporocisztaextraktumot Et11P-2 monoklonális antitestet tartalmazó oszlopon immunadszorbeáljuk, az extraktum adszorbeált frakcióját elválasztjuk a nem adszorbeált frakciótól, és az adszorbeált frakciót leoldjuk az oszlopról.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy SDS-PAGE-módszerrel 100 ± 10 kD látszólagos molekulatömegű terméket állítunk elő.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 8. ábrán bemutatott aminosavszekvenciával rendelkező terméket vagy annak fragmensét állítjuk elő.

4. Eljárás a 14. igénypont szerinti proteint vagy annak polipeptidfragmensét vagy immunogén ekvivalensét kódoló polinukleotidszekvencia előállítására, *azzal jellemezve*, hogy natív Eimeria tenella-ból izoláljuk vagy rekombináns úton előállítjuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 6. ábrán bemutatott kódoló nukleotidszekvenciát vagy annak szubszekvenciáját állítjuk elő.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 6. ábrán bemutatott kódoló nukleotidszekvenciát állítjuk elő.

7. Eljárás rekombináns vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 4–6. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotidszekvenciát – a polinukleotidszekvencia kifejezését lehetővé tevő kontrollszekvenciához képest megfelelő helyzetben – egy alkalmas vektorba beépítjük.

8. Eljárás gazdaszervezet előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy alkalmas gazdaszervezetet egy, a 7. igénypont szerinti eljárással előállított rekombináns vektorral transzfektálunk.

9. A 4. igénypont szerinti eljárás Eimeria tenella faj antigéntulajdonságaival rendelkező protein- vagy polipeptidfragmens előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 8. igénypont szerinti eljárással előállított gazdaszervezetet tenyésztünk.

10. Eljárás egy, az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított proteinnel vagy polipeptiddel immunreaktív antitest vagy antiszérum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy állatot immunizálunk egy említett proteinnel vagy polipeptiddel, és összegyűjtjük az antitestet és/vagy antiszérumot.

11. Eljárás egy Eimeria faj immunológiai tulajdonságaival rendelkező protein vagy annak polipeptidfragmense előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy Eimeria faj sporocisztájának extraktumát egy, a 10. igénypont szerinti eljárással előállított antiszérumot tartalmazó oszlopon immunadszorbeáljuk, az extraktum adszorbeált frakcióját elválasztjuk a nem adszorbeált frakciótól, és az adszorbeált frakciót eluáljuk az oszlopról.

12. Eljárás Eimeria-fertőzés ellen védő hatású vakcina előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1–3. vagy 11. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított proteint vagy polipeptidet vagy egy, a 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított polinukleotidszekvenciát, vagy egy, a 7. igénypont szerinti eljárással előállított rekombináns vektort, vagy egy, a 8. igénypont szerinti eljárással előállított gazdaszervezetet, vagy egy, a 10. igénypont szerinti eljárással előállított antitestet a vakcinakészítésben szokásos módszerrel vakcinává alakítunk.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a következő aminosavszekvenciák valamelyikével rendelkező vagy ezek valamelyikét tartalmazó polipeptideket állítunk elő:

- ISPQKPGSPPCPTCEAPGRSCEAEQPPGLTR,
- PVDEVVGDWEDWGQCSEQCGGGRTRNR

GPS.

14. Eimeria tenella immunológiai tulajdonságaival rendelkező protein – amely lényegében véve a következő lépésekből álló elválasztási művelettel nyerhető:

- a) E. tenella sporocisztaextraktum immunadszorpciója Et11P-2 monoklonális antitestet tartalmazó oszlopszubsztráton;
- b) az extraktum adszorbeált frakciójának elválasztása a nem adszorbeált frakciótól;
- c) az adszorbeált frakció leoldása az oszlopszubsztrátról

– vagy ennek polipeptidfragmense vagy ezek immunológiai ekvivalense.

15. A 14. igénypont szerinti protein, amelynek látszólagos molekulatömege SDS–PAGE-meghatározással mintegy 100 ± 10 kD.

16. A 14. igénypont szerinti protein vagy fragmense, amelyre jellemző a 8. ábrán bemutatott aminosavszekvencia.

17. Polinukleotidszekvencia, amely egy, a 14. igénypont szerinti proteint vagy annak fragmensét kódolja.

18. A 17. igénypont szerinti polinukleotidszekvencia, amely a 6. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciának vagy szubszekvenciájának felel meg.

19. A 17. igénypont szerinti polinukleotidszekvencia, amely a 6. ábrán bemutatott nukleotidszekvenciának felel meg.

20. Rekombináns vektor, amely egy, a 17–19. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotidszekvenciát tartalmaz a polinukleotidszekvencia kifejeződését lehetővé tevő kontrollszekvenciához képest megfelelő helyzetben.

21. Gazdaszervezet, amely a 20. igénypont szerinti vektorral van transzfektálva.

22. Antitest vagy antiszérum, amely immunreaktív egy, a 14–17. igénypontok bármelyike szerinti proteinnel vagy polipeptidfragmensével.

23. *Eimeria* faj immunológiai tulajdonságaival rendelkező protein – amely lényegében véve a következő lépésekből álló elválasztási művelettel nyerhető:

- 5 a) egy *Eimeria* faj sporociszaextraktum immunadszorpciója egy, a 22. igénypont szerinti antiszérumot tartalmazó oszlopszubsztráton;
- b) az extraktum adszorbeált frakciójának elválasztása a nem adszorbeált frakciótól;
- 10 c) az adszorbeált frakció leoldása az oszlopszubsztrátról

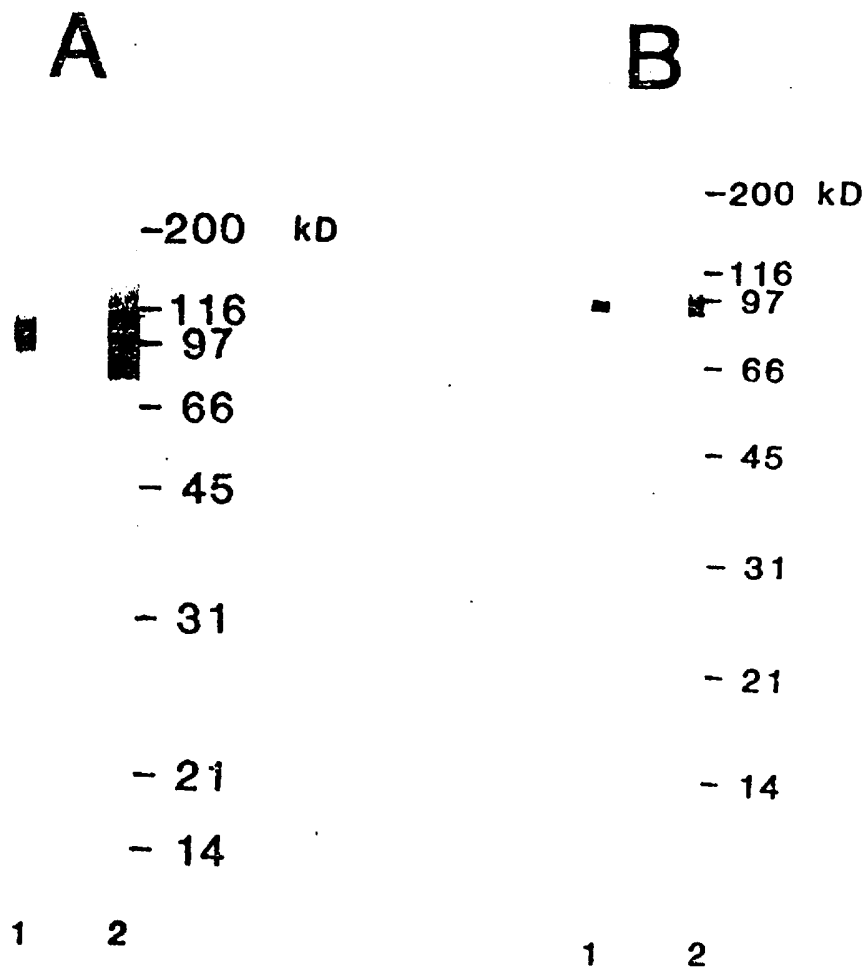
– vagy ennek polipeptidfragmense.

24. *Eimeria*-fertőzés ellen védő hatású vakcina, amely egy, a 14–17. vagy 23. igénypontok bármelyike szerinti proteint vagy polipeptidet vagy egy, a 17–19. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotidszekvenciát, vagy egy, a 20. igénypont szerinti rekombináns vektort, vagy egy, a 21. igénypont szerinti gazdaszervezetet, vagy egy, a 22. igénypont szerinti antitestet tartalmaz.

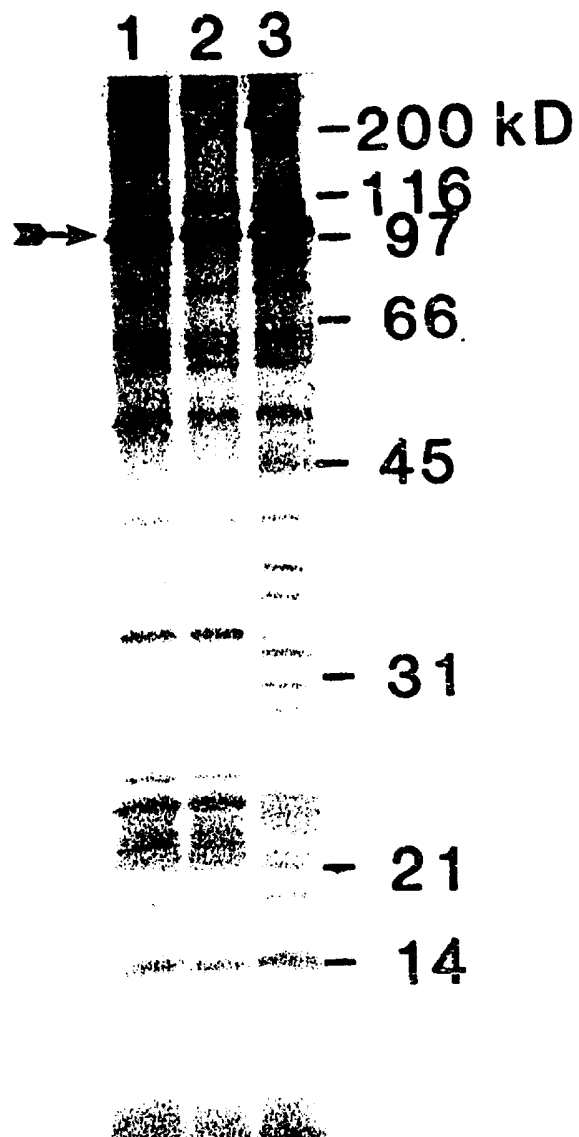
25 25. Polipeptidek, amelyek a következő aminosavszekvenciák valamelyikével rendelkeznek vagy tartalmazzák azt:

- ISPQKPGSPPCPTCEAPRGRSCAEQPPGLTR,
- PVDEVVGDWEDWGCSEQC GGGKTRNR
- GPS.

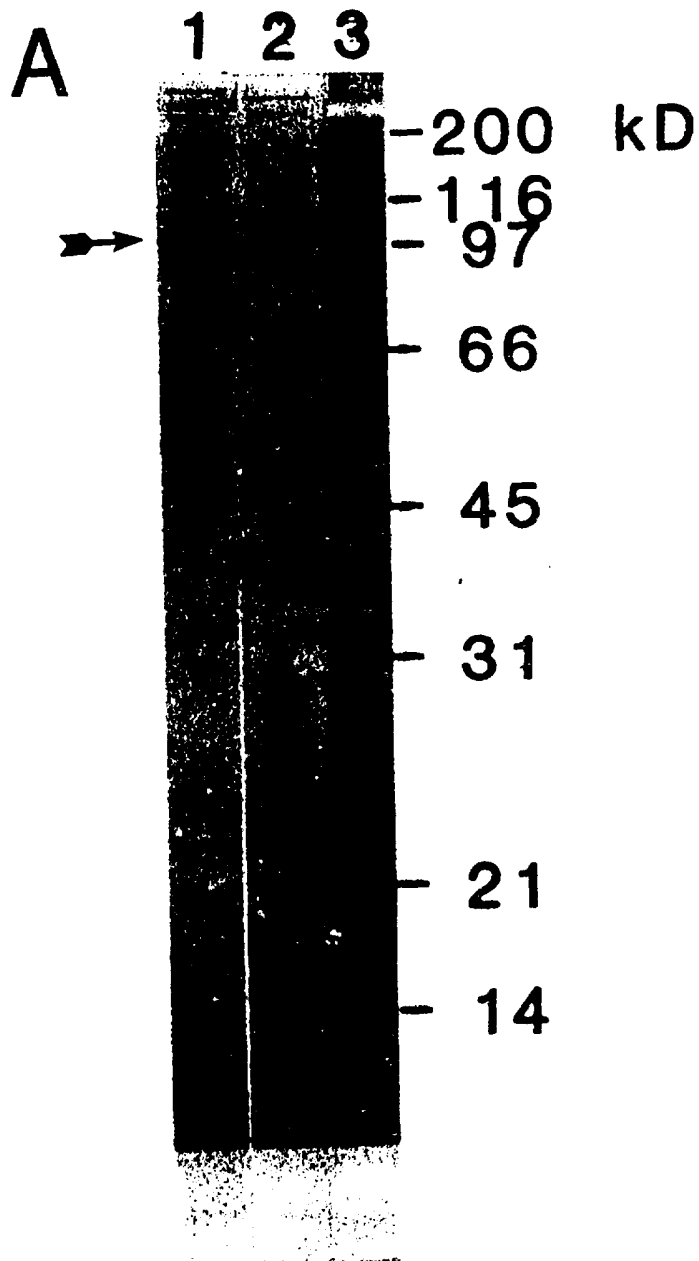
1. ábra



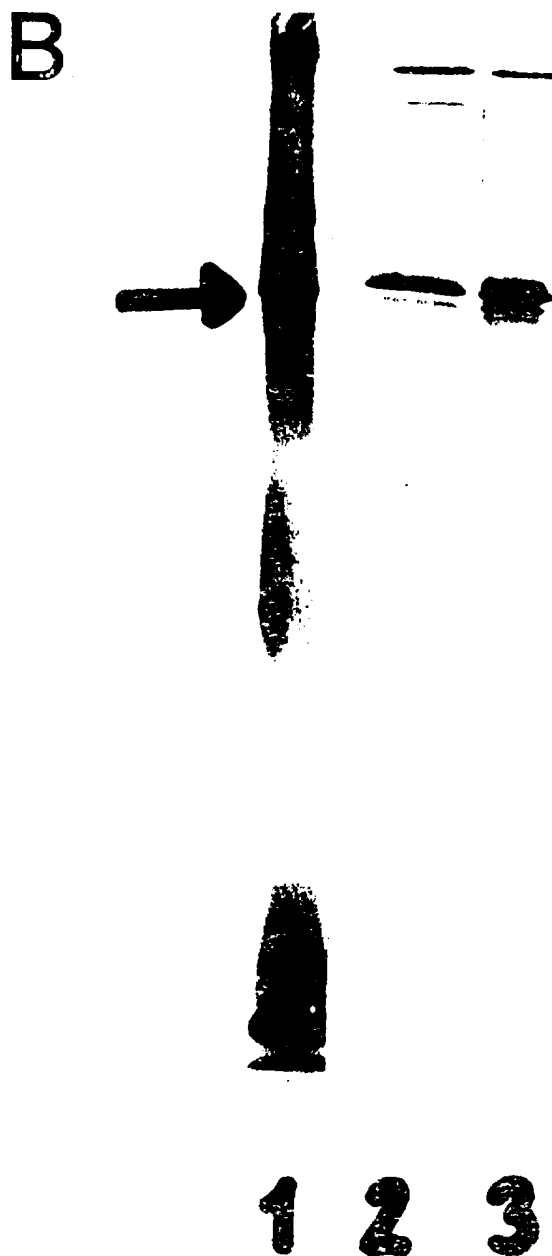
2. ábra



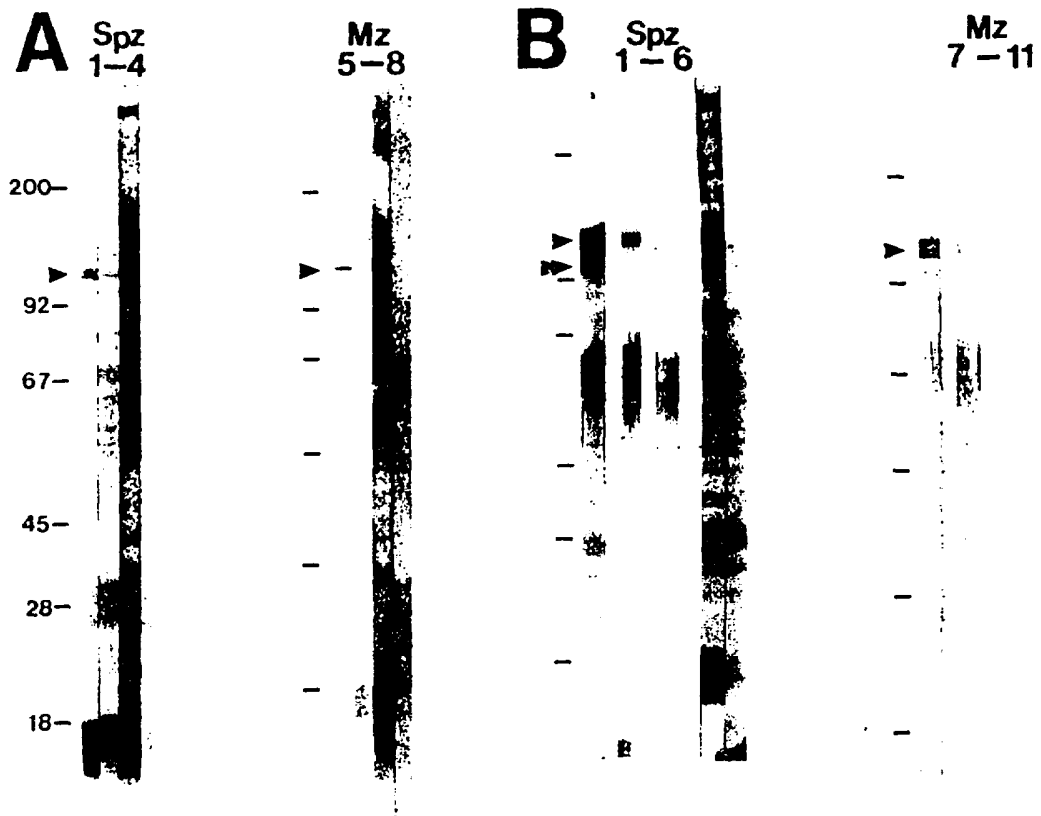
3a. ábra



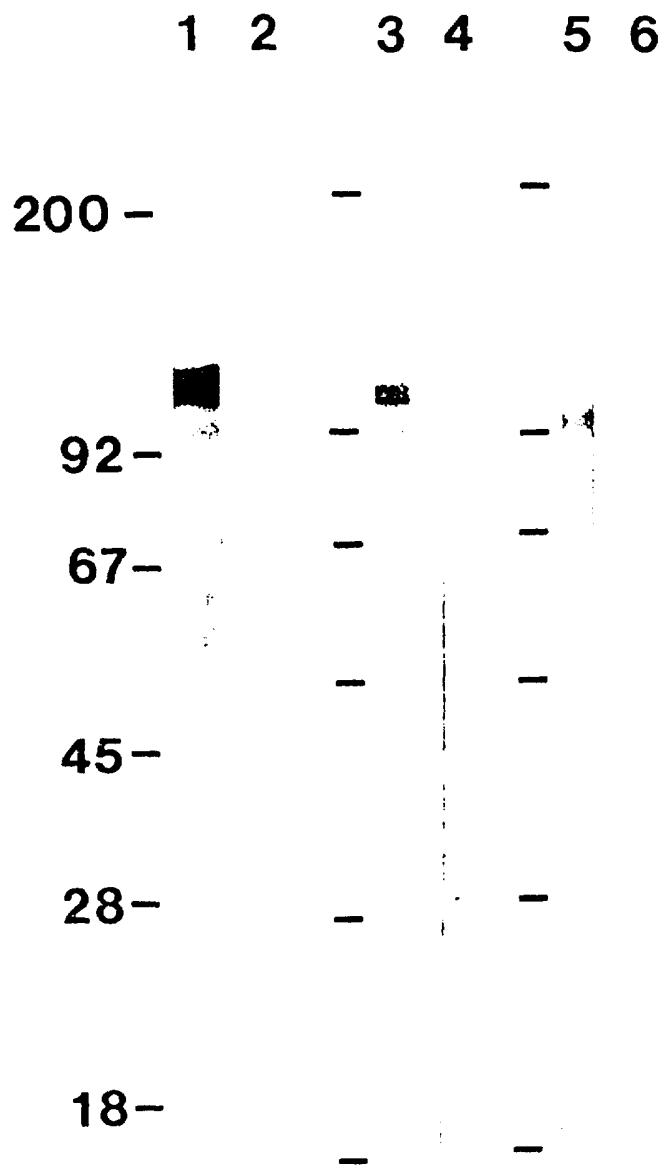
3b. ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra

1 AAGCTTAAGCAAGACTACAGTGAACCGGTAACACATGATGAGTCTTGCCCGGAGCCTTG
61 CTAAAACAAACGAGTTCGCTACGTCGATTGCATCATATACACCTCATACTAACCAGTCCA
121 GATAATGAACATTCGCAATCAAACCTTACAACCAAACCTTTTGAAGCAATTGTGCGAACAAGA
181 ACTAATTTGCCCTCTCGAAGGATCTGAAATGCAAGCAAACATAACTATTCCCTTGTGTGGAA
241 TCGACATATGCACACAGCGCAGAGACCGTCACTTTAAACCATGCTTGGAGGAAACTTTGC
301 TTTTCCATGTCTAATGGCAAAAAGCAAGTTGGAATAACACTCTCTCAATATCTAGCTACGG
361 ATATTCTFACACTATCAGAGCCCGATACGTGTGTGAAGGCGAGCGAAGCTGTTCACTCGTG
421 GCTTCAGCTGGAAAAATAATGACAATGCGCTAGACGCGGGAGTCGAAGCGTGTCTGTAT
481 GCCTGCTGAGTAAACCCACAGGAAATGCGCTTAATAAGAGCTGAAGAAAGCAATAACAAT
541 ATACGTGATCTGCCCTGACCTTGCAGATCCCGGGAACACCCAAGTCATTTGGCGGCCAG
601 CCGGAGTACGCACTAGCAGGACCCCTTGGCGAGCCATCCGACTTCAATGCTCTCACAGTA
661 GAATTCCTGGTTAGGTTTCAAACATATTGTTTGTGTTAGGTCATTTTCTTAATCTCTTATT
721 CTTTCATCTTTTTTACCAGTTCGCTTTCTTGCATTCATTCCCGCAATGGCGCCCTTCCCTC
M A P L P
R R R L A P C R A L S L L V G L L A A S
781 GCGAAGGCTAGCGCCCTGCAGGGCATTATCATTTGCTGGTTCGTCGCTTGCCTGCAAGTT
F A F S S L Q P [-----
841 TTGCTTTTTCTCTTTACAGCCAGGTTGCTCATTCATGGTTATAATGGCAAGTGGCTCCG

901 TTGCAAAGTTTGTGCCCATTTGCTGCTATTCCAACTGAGAGTGGTTCCTGGCCATGGCGAAC

961 AGTGCCTTTGACCGTGGCTTCCTGATCAATGCTGCTCACAGAAGTCTTAGCAGTTGCAAAG

1021 ATAGGGTCATAGTTAGTCAGCAGTGTACCTGGGTGTPTTFAATTGGTAAAGGGTTCGAG

1081 AGGTTTGGGCTCAATGGCCAGCATCCGTTTGCCTCGGGATCTTCCCGTAAAGGTAGCG (INTRON 1)

1141 CACGTTGTCCCTTGTGGCTTTCCCTTGGGGTGAAGAAGTTGATTTAGGCAGAAATTTTGC

1201 CCGCCACAGGCTTGAAGGACATTAACCTCTGGGTGATGTAACGCTGCTTGAAGTGAATATT

1261 GCCCCCTTGTGTTTGGCTTGGCTAGGTCGTACAGTGTCACTTGCCTGTTGCATTGCTG

1321 CCTTCTTATGTAACGGGTTGACTTAGCAGGCTTCATGCGAACCTTGGATGTTTGTAT
---]G A T T S S G Q D Q V C T S L L D V M
1381 TCAGGCGCAACTACCAGCTCTGGCCAGGATCAGGTGTGCACAACCCCTCTTGGATGTCATG
L V V D E S G S I G T S N F R K V R Q F
1441 TTGGTAGTTGATGAGTCGGGCTCCATTTGGCACATCGAACTTCAGGAAGGTGCGGCAGTTC
I E D F V N S M P I S P E D V R V G L I
1501 ATCGAAGACTTCGTGAATTCATCCCGATTTCTCCAGAGGACGTTGCTGTTGGGTTAATC

T F A T R S K V R W N L S D P K A T N P
1561 ACTTTTGC AACCCGTTCCAAAGTTCCGTTGG AACCTGAGTGATCCGAAGGCTACAAATCCT
S L A I S A A R S L S Y S T G V T Y T H
1621 TCCTTGGCTATATCAGCAGCTAGATCTCTAAGCTATTCAACAGGGCTCACCTACACGCAT
Y G L Q D A K K L L Y D T N A G A R N N
1681 TACGGTCTTCAAGATGCGAAGAAGCTGCTCTACGACACCAATGCTGGAGCTAGAAATAAC
V P K L V L V M T D G A S N L P S Q T R
1741 GTACCCAAGTTGGTTTTGGTCACTGACTGACGGCGCAAGCAATCTCCCGTCTCAAACGAGA
S S A A A L R D A G A I V V V L G V G S
1801 TCTTCTGCTGCAGCCCTGCGTGATGCAGGAGCCATCGTAGTTGTCTTGGGAGTCCGCTCA
G V N S S E C R S I A G C S T S N C P R
1861 GGAGTCAATTCGAGTGAGTGACAGGAGTATTGCTGGCTGTTCCGACTTCAAATTTGCCCCAGG
Y L Q S N W S N V T Q Q V N G I I K A A
1921 TACTTGCAGTCAAACCTGGTCAAACGTCACGCAGCAGGTC AATGGTATCATCAAGGCTGCA
C K D L A K D A V C S E W S E Y G P C V
1981 TGCAAAGATCTGGCAAAGGATGCGGTGTGTAGCGAATGGAGCGAATATGGACCTTGTGTG
G E C G K E G V Q T S T R V E I S P Q K
2041 GGGGAATGTGGCAAAGAAGGGCTGCAGACGAGCACTCGAGTGGAGATATCTCCG CAGAAG
P G S P P C P T C E A P R G R S C A E Q
2101 CCGGGTCACTCTCTTGGCCGACATGTGAGGCACCGAGGGG CAGGTCTTGTGCGGAGCAG
P P G L T R T Q P C T M P V C K T D A H
2161 CCTCCCGACTTACTGGGACGCGCCGTTGCAAGATGCCAGTGTGCAAAAACGGATGCTCAT
C G E F G A W S E W S T T C G T A T R K
2221 TGCGGGAGTTTGGCGCATGGTCTGAGTGGAGCACTACGTGCGGAACGGCGACGAGGAAA
R Q R E G Y N S P P A A G G G L S C M E
2281 AGGCAGAGGGAAGGCTACAACAGTCCACCTGCAGCCGGTGGTGGGCTTTCTTGCATGGAA
Q N P P K H E F E V E T V Q K S P C P V
2341 CAAAATCCGCTAAACATGAATTCGAGGTTGAAACGGTGCAGAAAATCCGCCGTGCCAGTT
Q Q Q P G P W S E W T E C S A T C G G G
2401 CAGCAACAACCGGGACCCCTGGAGTGAATGGACAGAGTGCTCAGCAACCTGCGGAGGAGGT
T K H R E R E G L P Q E G E L Y G G Q T
2461 ACTAAGCATCGCGAGCGAGAGGGTTTGCACAGGAAGGGGA ACTGTACGGGGGACAGACT
L E Q Q G I A V R E T A S C S E N P C P
2521 TTGGAACAACAAGGCATGCTGTGAGGGAAA CTGCTTCGTG CAGCGAGAACCCTGCCCC
I D A T C G E W T E Y S A C S R T C G G
2581 ATCGACGCAACCTGCGGAGAATGGACAGAGTACAGTGGCTGCTCCAGAACTTGGGAGGC
G T Q E R K R E P W L D N A Q H G G R T
2641 GGTACCCAAGAGAGGAAGAGGGAGCCGTTGGTGGATAATGCCAACAACGGGGGGCCACC
C M E Q Y P D G P I S V R E C N T Q P C
2701 TGCAATGCAACATATCCATGATGGGCCCATATTCGGT CAGGGAGTGC AACACCCAGCCGTGC
P V D E V V G D W E D W G Q C S E Q C G
2761 CCTGTGGACGAACTTACTTGGTCAATTTGGGAAGACTCCGGGCAATGCAGOGAACAGTGTGGT
G G K R T R N R G P S K Q E A M F G G K
2821 GGCCGCAAGCCGACTCGTAATCGCGGCCAAGCAAGCAAGGCCATGTTCGGAGGCAAG

6. ábra (folytatás)

6. ábra (folytatás)

T V A Q Q N A E L P E G E K I E V V Q E
2881 ACAGTTGCTCAACAGAACGCAGAGCTCCCTGAAGGOGAGAAGATTGAGGTGGTTCAGGAA

E G C N E V P C [-----
2941 GAAGGATGCAATGAAGTCCATGCGGTGAGCTAGTGTAGTTGGAAGGGCAAAGAAGCTGC

3001 GACTCGGTGTTGTACCCCTGTACAAGCTTTCAGTCGAATAATAACTGTTTCTGGCTTTGT

----- (INTRON 2)
3061 CCGGTAGTCAATGGCGAATTCCTGGACAGTTAGTAGGGCTCTCTTGCTCACCTTCAGACTTT

3121 AGAGCGAAAGCTGTTAATTAAGGCCGTATAAGCTCAGCAGGOGACATTTTGTCTGGGGT

-----] G P C T L P F S E W T E C E S C S
3181 TTCTGGGCACAGGACCTTGCACGCTCCCTTCAGTGAGTGGACCGAATGCGAGTCGTGCT

G H R T R E S A V A F D Y T D R M C S G
3241 CCGGCATAGAACCGGAATCCGCAGTAGCATTTGATTACACTGACAGAATGTGCAGTG

D T H E V Q S C E E Y C S Q N A G G G A
3301 GTGACACACAGGATACAAAGCTGTGAGGAATACTGTTCCAAAATGCTGGAGGGGGT

G G D G G A G G G T G G S G E E E G K E
3361 CTGGAGGAGATGGGGCGCAGGAGGAGGACTGGAGGCTCTGGAGAGGAGGAAGGAAAGG

E S S G F P T A A V A G G V A G G V L A
3421 AGGAATCGAGTGGATTTCCAACTCAGCTGTAGCCGGTGGGTGGCTGGGGGAGTCTCTG

I A A G A G A F Y G L [-----
3481 CCATGCTGCGGGAGCTGGAGCGTTTATGATGTGAAGTTTATTTAGCCGAAGCTGGCC

----- (INTRON 3)
3541 TCTTAGCCGTTAACAGCTGTTTGGTGTGATCCCTCTGTGCTTCCCTGGTCTACCTTCT

3601 CAAGCTGATCCGAATGGTAGGACGCCGATTGAGTGGTTGCOGTCAAATATCTGGTGTG

-----] S G G S A A A A T E A G A E V M
3661 TGCTGTTACAGGAGTGGTGGGAGCGGCTGCTGCCACTGAAGCAGGTGCTGAAGTGTG

T E A G T S N A A E V E K E S L I S A G
3721 ACAGAAGCTGGTACATCCAATGCTGCTGAGGTAGAAAAGGAGAGCCTCATCAGTGCAGGT

E Q S E M W A S *
3781 GAACAATCAGAGATGTGGGCATCCCAAATGAAACGTCGCGCGCGGGTTCGAAAAGG

3841 TGCGGATCTTGATATCTGTGAACGAATTATTTACTAACAATCGAGCTCCTTGACCTCCCG

3901 TTGGCAAATCATTTACCAAGCATCTCTGGGCAATAGCTTCTTGAACAAGACAACCGAATG

3961 TCCAACCTGGGAACAGCTATATTGCGAAGTGTGGTGTTCAAACCAGAAGAGACAGCC

4021 TCATGTGATGTTAGGGTTGGGCGCCCTCTTCCCTTATTTATCCCATTTCTCCGCTT

4081 CATCTTTCCGCCCTCTCTCTGTGGCGGCTATTTTGGCTGTATTTGGTGCCTGGCGGACAT

4141 GAAAGAGAGATTGGCGTTATTTGCAGCGTGGCAGGCCATGGTAGGGTTGGATAACACTC

4201 ATTTGGTGAAGCGCAAGGCAACAGGGCCACGTTTACCTCCTGGTGGTCAATGGGGCAGTTG

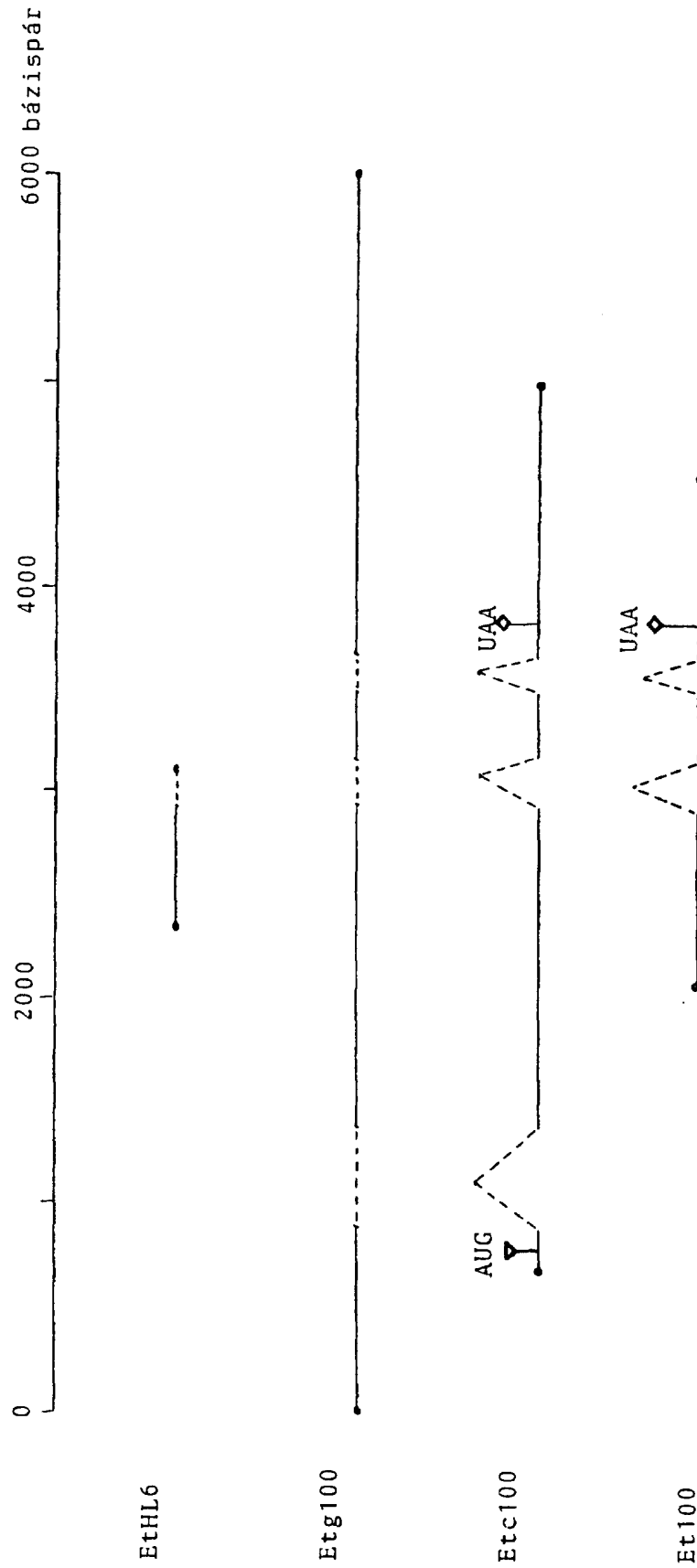
4261 GTTCTGTGATTTGGTGTGTTCTGTTTCAAGGGGCGGTAATGGGCAGCAGAAGCTTCTGCCA

4321 GCCACCACACAATCGAAGCAACAATAAGGGAGGTTCTGCTAACAATTTGTGCGTAGTCAT

6. ábra (folytatás)

4381 GATTGTAGGTAGGCTCCGTTTCGAAGATGAATGACCGGGAGCAGCCTGAATGAAACTTGA
4441 CTCCTCAAAGAAGGGAATTC AAGAAAATACGGTACACCATTCTCACTTTTTGAGGTGCAGC
4501 TAACGAGGACTTTTTCTTAGTAACGGTATGGCATCGTGGGAGCAAGGAACAGTGTGTGTG
4561 TTGCATTGTGAGCACCGGAGGTGTGGTCCCTCAGAATATAGTCTGCGAGTGGGAAGACAT
4621 TAAGGACCC AAGAGCC TTTTATTGCTGGGTAGAATTCAATGTTGTTCTGGCATGTATCTT
4681 CGTGGACTTTTTTGTCTGTATATCTACTCTAAAGTGAGTGA TGGTTGGACGCATTA
4741 AAGTAATTTGCC TTTCCCGTGAGGCAAATATTTTCTGGTGCTGAGGGGTGTGAGCTCTC
4801 TTTTTGCCGTCGTGGGCTGACGGACTGGAATTAACGAAACAAAGAGGTGGATCAATCCCA
4861 AAACAGTGCGACTAGCACCACTCGGCAGCACOGAAGGCC TTAACGCATGAAGTGCTTCTG
4921 TCTTTGAGAGCCCTAGCGTGGCGTTTTTCTTCAACTCACCCAATAGCTTTCTTAAAT
4981 CGTGGGAATAGCCGCATTTGTGGAACAGTACTCGAGAAGCCAGTGTACGATATAGCGTGA
5041 TGCAGGATAGGGCGAAGAAGTTGCGTAAATGCAGCAGACTGCTCAGTCAGGGTTCAGTCGA
5101 GTAAAGGCCAGGGTCTGTGAGTAAAGGTCAGTTTATTTCTTCAGAGGATGCGCTGGAAGC
5161 GAACAGGACAAATGGTGTGTAGCAGGAACGGGATCGCACTCTGCTCCGGCAGGTACCTTT
5221 CCTTGTGGGTGAAGCATAGAAACAATGGGGAAGGGCTTGTACAATTTTGGCATGAGAA
5281 GGTGACTCCTTCCCGGAGCC TTAGTGGTGGGGGAATTGCAAGGAAGTGCAACTAG
5341 AGGTCCGTGCAAGGTTTTGGTTAGAGGTCACCCAGAATCAAGACAGAATTCTCTGCGACG
5401 TCGCTATCCCAGCAGAGTAACTATCTCTGCTTTTGTGTGAGAATTTGGACCAGAGGTCA
5461 GCGTGGCTCTGATTAAGGCACAATAACGACGTCGCGAGGGCGCATCCTTTTTGCATGCT
5521 TCCAGTTCGAAACTGTACTCTGGCTTCGCTGCCAGAAGGGGCAATGCTTATTACTTAAG
5581 ATAGAGGAGACTGTGACGATTAATAAAAACCGCGTTAACGAGCAGAAGCCACAAGCACCT
5641 CTCCGAGCACGCGAGGGCAGACCAAGACTATTGCTGCGCAACCGAATTTCTACATTTTGT
5701 GCCTTACTGTGGAAAGGTGGTGTGGGATTGGACGTTTGTCTGCACACCGTTGACTCTCAC
5761 TGTGCAGACTCCCAACGGACCAACCAGTGGCTCGCTGGCTACGGTTGCTTTTACGTGAA
5821 ATGCAGAGATAGTGTACTCTAAACTCTAATTTTCCCCATTGCCAATGATGAAATGACC
5881 CTAAAATTTAAGTATGACTTGGAGAAAAGAAATGGCTTAGGAGGGAGCCGCATGGCGTGA
5941 ATCTGCGTAGAGCAACTCGACGACGTC CCCCCGTGGCGCCCCCAAGCTT

7. ábra



8. ábra

```

      10      20      30      40      50      60
MAPLPRRRLA PCRALLLVG LLAASFAPSS LQPGATTSSG QDQVCTSLLD VMLVVDESGS
      70      80      90      100     110     120
IGTSNFRKVR QFIEDFVNSM PISPEDVRVG LITFATRSKV RWNLSDPKAT NPSLAISAAR
      130     140     150     160     170     180
SLSYSTGVTY THYGLQDAKK LLYDTNAGAR NNVPKLVLM TDGASNLPSQ TRSSAAALRD
      190     200     210     220     230     240
AGAIVVVLGV GSGVNSSECR SIAGCSTSNK PRYLQSNWNS VTQQVNGIIK AACKDLAKDA
      250     260     270     280     290     300
VCSEWSEYGP CVGECGKEGV QTSTRVEISP QKPGSIPCPPT CEAPRGRSCA EQPPGLTRTQ
      310     320     330     340     350     360
PCTMPVCKTD AHCGEFGAWS EWSTTCGTAT RKRQREGYNS PPAAGGLSC MEQNPPKHEF
      370     380     390     400     410     420
EVEFVQKSPC PVQQQPGPWS EWTECSATCG GGTKHREREG LPQEGELYGG QTLEQQGIAV
      430     440     450     460     470     480
RETASCSENP CPIDATCGEW TEYSACSRTC GGGTQERKRE PWDNAQHGG RTCMEQYPDG
      490     500     510     520     530     540
PISVRECNTQ PCFVDEVVGD WEDWQCSEQ CGGGKTRNR GPSKQEAMFG GKTVAQQNAE
      550     560     570     580     590     600
LPEGEKIEVV QEEGCNEVPC GPCTLPFSEW TECESCSGHR TRESAVAFDY TDRMCSGDTH
      610     620     630     640     650     660
EVQSCSEYCS QNAGGGAGGD GGAGGGTGGG GEEEGRESS GFPTAAVAGG VAGGVLAIAA
      670     680     690     700     710     720
GAGAFYGLSG GSAAAATEAG AEVMTAAGTS NAAEVEKESL ISAGEQSEMW AS

```

Aminosavtartalom statisztikai elemzése

	A	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	B	Z	H
N	38.	68.	50.	44.	67.	86.	23.	23.	64.	36.	0.	0.	7.	
%	5.3	9.6	7.0	6.2	9.4	12.1	3.2	3.2	9.0	5.1	0.0	0.0	1.0	
w	3919.	5921.	5055.	4273.	4762.	4907.	2624.	2647.	8263.	4613.	0.	0.	960.	
	A	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	-	X	?	
N	36.	23.	11.	16.	36.	45.	13.	13.	13.	0.	0.	0.	0.	
%	5.1	3.2	1.5	2.2	5.1	6.3	1.8	1.8	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	
w	5623.	2948.	1443.	1811.	4074.	4461.	1913.	2121.	2421.	0.	0.	0.	0.	

teljes molekulatömeg = 74778.