

SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Mikrobiológiai Intézete

Cianobakteriális klónozó rendszer kidolgozása

a Pseudanabaena PCC 6903 fajra



CSISZÁR KATALIN

Doktori disszertáció

1 9 8 4.

B 5112



E 2.338

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezuton szeretnék köszönetet mondani Dr. Béládi Ilona professzornak, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézete igazgatójának, aki biztosította a feltételeket a munka elvégzéséhez, és Dr. Molnár József docensnek az értékes szakmai segítségéért.

Köszönettel tartozom a Szegedi Biológiai Központ Növényélettani Intézet Kékalga-virus kutatócsoportjának, vezetőjének Dr. Borbély Györgynek, a baktériumtörzsekért és az értékes szakmai tanácsokért.

Köszönetemet fejezem ki a Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet igazgatójának, Dr. Venetianer Pálnak és munkatársának, Dr. Udvardy Andornak, akik lehetővé tették, hogy a kísérleti munkát intézetükben végezhessem.

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

SDS	-	Na-dodecil-szulfát
EDTA	-	etilén-diamin-tetra-ecetsav
TCA	-	triklór-ecetsav
PPO	-	2,5 difenil-oxazol
POPOP	-	1,4-di-/2-5-fenil-oxazoil/-benzol
Brij	-	polietilénglikol-sztearinéter
DOC	-	nátriumdezoikolát
DTT	-	ditiotreitol
F	-	sex faktor
R	-	rezisztencia faktor
ATP	-	adenozin-trifoszfát
bp	-	bázispár
Ap	-	ampicillin
Sm	-	streptomycin
Cm	-	kloramfenikol

## TARTALOMJEGYZÉK

Oldal

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

IRODALMI ÁTTEKINTÉS	1.
A Cianobaktériumok általános jellemzése	1.
Plazmidok	2.
Restriktív endonukleázok	5.
Transzformáció	5.
Klonozó vektorok	8.
Plazmidmentes sejtek előállítás - plazmid-törlés	14.
CÉLKITÜZÉS	17.
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18.
Baktérium törzsek és plazmidok	18.
E.coli törzsek és plazmidok	20.
Táptalajok	20.
Tenyésztési körülmények	20.
Plazmid DNS tisztítása	22.
RP4 plazmid DNS tisztítása	22.
Nagy mennyiségű plazmid DNS tisztítása	23.
Gyors plazmid DNS tisztítása alkalikus lizissel	24.
Gyors módszer cianobakteriális plazmid izolálásra	25.
Cianobaktérium plazmid izolálás 4 literes kulturából	27.
Cianobaktériumok transzformációja	28.

	Oldal
E.coli transzformáció	31.
P <sup>32</sup> -jelölt plazmid DNS előállítása	31.
H <sup>3</sup> -imipramin kötődés meghatározása	32.
Membrán vezikulák preparálása	32.
P <sup>32</sup> -pBR322 DNS membrán kötődésének meghatározása triciklikus vegyületek jelenlétében	33.
DNS minták gélelektroforézise	33.
DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal	34.
DNS fragmentumok összekapcsolása polinukleotid ligázzal	34.
Plazmidmentes sejtek előállítása	34.
Plazmidtörlés SDS-sel	34.
Plazmidtörlés fenotiazinokkal	35.
A KISÉRLETEK LEIRÁSA ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	37.
Anacystis fajok plazmidjai	37.
Az Anacystis S9 36 Md plazmid restrikciós elemzése	37.
A Pseudanabaena PCC 6903 törzs plazmidjai	39.
A pHC 624 plazmid	44.
Hibrid plazmidok	45.
Plazmidmentes sejtek előállítása	54.
ÖSSZEFOGLALÁS	65.
IRODALOMJEGYZÉK	67.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A Cianobaktériumok általános jellemzése

A Cianobaktériumok a fotoszintetizáló prokarioták igen elterjedt csoportját alkotják /Stanier és Cohen-Bazire, 1977/. Figyelemre méltó genetikai komplexitásuk. A genom méret alsó határa / $1,6 \times 10^6$  dalton/ a baktériumokéhoz hasonló, de a felső határ / $8,6 \times 10^6$  dalton/ messze meghaladja az eddig leírt legnagyobb prokariota genomot. A nagyobb méretű genommal rendelkező fajok mindig nagyobb morfológiai differenciáltságot és működésbeli komplexitást mutatnak /Herdman, 1979/.

A genom mérete, a gének helyzete és megoszlása arra utal, hogy a genom egy kisméretű ősi genom duplikációjával keletkezett, más prokariota fajok genom evolúciójához hasonlóan /Wallace és Morowitz, 1973/. Az így keletkezett redundáns DNS-nek mutációkkal és ezt követő evolúcióval különböző formái jöttek létre.

A Cianobaktériumok olyan tulajdonságai, mint a növényi kloroplasztiszokéhoz hasonló fotoszintézis, kromatikus adaptáció, a heterocisztát képző fajok és néhány egysejtek faj /Gloeotecha, Aphanocapsa/ aerob nitrogénkötő képessége és a differenciált sejtfarmák jelenléte /heterociszta, hormogonium/ amelyek közül sok egyedülálló ebben a prokariota csoportban, lehetőséget nyújtanak arra, hogy e jelenségeket egysejtű szervezetekben tanulmányozzuk.

Más tulajdonságok, mint például a gyors növekedés, homogén szuszpenzióképzés folyadék-kultúrában, reprodukció szilárd táptalajon, replica plating lehetősége és a nagy gyakoriságú genetikai anyag kicserélődés egyuttal megteremti a genetikai elemzés számos feltételét.

A génelemzés egyik hagyományos módszere mutációk indukálása és elemzése. Erre alkalmas mutánsokat már izoláltak és biokémiaailag jellemeztek, de részletes genetikai térképet ezek alapján felállítani nem lehet kis számuk miatt /Delaney és mtsai., 1976; Ladha és Kumar, 1978; Doolittle, 1979; Shermann és Cunningham, 1977/.

A molekuláris DNS klónozás technikájának jelenlegi szintje *Escherichia coli* rendszerben lehetővé teszi, hogy a DNS molekula egyes szakaszait elkülönítsük, amplifikáljuk az itt kódolt géneket, megállapítsuk a gén szerkezetét, a nukleotid szekvenciát és következtessünk a gén regulációjára és expressziójára.

Hasonló módszer létrehozása a Cianobaktériumban lehetővé tenné a fotoszintézis, nitrogénkötés és sejtdifferenciálódás molekuláris szintű tanulmányozását.

### Plazmidok

A DNS klónozás lehetőségének felméréséhez kiinduló pontul szolgál az a tény, hogy néhány Cianobaktérium faj cirkuláris extrakromoszómális DNS-t tartalmaz /Asato és Ginosa, 1973; Roberts, 1976; Stanier és Cohen-Bazire, 1977; Friedberg és Sheijffers, 1978/. Más fajok plazmidot nem tartalmaztak, ezek: *Synechococcus* PCC 6307, *Pseudanabaena* PCC 6901, Micro-



*cystis aeruginosa* NRC-1 *Gloeocapsa alficola* W, *Nostoc* MAC /Lau és Doolittle, 1979/.

A természetes plazmidoknak vektorként való felhasználása változatlan formában nem lehetséges, az eddig leírtak ugyanis kriptikusak, a legtöbb faj többféle plazmidot hordoz és ezek kompatibilitása más törzsek plazmidjaival nem ismert /Van den Hondel, 1979; Sapiensa és Doolittle, 1980/.

A leírt plazmidok mérete 1,9-75 Md között változott. A plazmidok bázisösszetétele szignifikánsan különbözött a kromoszómális DNS bázisösszetételétől /Roberts és Kothe, 1976; Lau és Doolittle, 1979/. A különböző törzsekben lévő plazmidok szekvencia homológiát mutatnak, amely transzpozonok jelenlétével magyarázható /Lau és Doolittle, 1980; Sapiensa és Doolittle, 1980/. Bár a transzpozonok gyakran kódolnak antibiotikum rezisztenciát /Bukhar, 1977/, a cianobakteriális plazmidok esetében fenotipikus rezisztenciát nem találtak /Lau és Doolittle, 1979; Lau, 1980/. Olyan sejtfunkciót sem sikerült azonosítani, amely plazmidban lenne kódolva. Egy-egy plazmid spontán elvesztése, mint például az  $5,3 \times 10^6$  dalton molekulasúlyú plazmid a *Synechococcus* PC 6301 törzsből /Lau és Doolittle, 1979/ és az  $5,9 \times 10^6$  dalton molekulasúlyú plazmid az *Anacystis quadruplicatum* BG-1 törzsből, fenotipikus változást nem okozott /Lau, 1980/. Azok a törzsek, amelyek plazmidot egyáltalán nem hordoznak, nem különböznek a plazmidot tartalmazóktól sem metabolizmusukban, sem a differenciált sejttípusokban, sem morfológiailag /Simon, 1978/. Igazolták, hogy

az *Anabaena* 7120 plazmidjai nem hordoztak azonosítható nif géneket /Mazur, 1980/. A *Synechococcus* PCC 6001 5 Md plazmid restriktív fragmentjei különbözőképpen íródtak át fényen és sötétben *in vitro* /Lau és mtsai., 1980/. Más plazmidokról nem rendelkezünk hasonló információval.

Restriktív enzimekkel történt vizsgálatok a cianobakteriális plazmidok azonos számú hasítóhelyét fedték fel, ami a plazmidok közeli rokonságára utal /Van den Hondel, 1979; Lau és Doolittle, 1979/. Ez a tény nem meglepő, ugyanis a vizsgált három törzs közeli kapcsolatban áll /Rippka és Derunelles, 1979/. Azonban hasonlóságot mutatott az eltérő genusba tartozó *Synechococcus* PCC 6707 törzs plazmidja is /Herdman és Janvier, 1979; Hondel, 1979; Lau, Sapienza és Doolittle, 1980/. Azonos plazmidok jelenléte négy *Synechococcus* fajban bizonyíték transzferálható természetükre és az intergenerikus transzfer lehetőségére /Herdman, 1976/.

Teljes homológia azonban nem volt kimutatható közeli fajok, az *Agnetum quadruplicatum* BG-1, RP6 és a *Coccoloris elabens* azonos méretű plazmidjaival végzett hibridizációs kísérletekben /Rippka és Derunelles, 1979; Lau és Sapienza, 1980/. Homológ régiók viszont a különböző méretű plazmidok között is voltak és ezek nem korlátozódtak az egyes restriktív fragmentekre, alátámasztva azt a nézetet, miszerint transzpozábilis elemekkel azonosak /Lau, Sapienza és Doolittle, 1980/.

### Restrikciós endonukleázok

Viszonylag kevés számú Cianobaktériumból ismerünk szekvenencia specifikus enzimeket. Előfordulási helyük és szekvenencia specifitásuk az 1. táblázatban látható. Más bakteriális csoportokhoz hasonlóan /Roberts, 1978, 1981/ az isochizomerek előfordulása gyakori még egymással kapcsolatban nem lévő fajokban is. Például Agu I és Ava I enzimeket egy egysejtes és egy fonalas cianobaktérium termeli, felismerőhelyük azonban közös: C+PyCGPuG. Más esetekben egy faj két tagja gyakran különböző endonukleázokat tartalmaz /Roberts, 1980/.

### Transzformáció

A Cianobakteriális transzformációs rendszer létezése, megfelelő vektor létrehozása után, lehetővé teszi a cianobakteriális gének *A.nidulans*-ban történő klónozását. Az első transzformációhoz hasonló jelenséget először szexuális, illetve parasexuális folyamatként írták le. Két eltérő antibiotikum rezisztenciájú *Synechococcus* törzs keverék tenyésztésében kétszeres rekombinánsokat figyeltek meg /Bazin, 1968/. Tipikus genetikai transzformációt írt le Shestakov /1970/. *A.nidulans* recipiens sejteket transzformáló DNS jelenlétében fényen inkubáltak, majd a reakció leállítására DNase-val kezeltek. Transzformánsok szelektálására növekvő koncentrációban antibiotikumot tartalmazó agarboritást alkalmaztak. Az antibiotikum koncentráció az agar teljes térfogatában 2 µg/ml volt. Az izolált rezisztens telepek, vagyis transzformánsok 98%-a 6-7 transzfer után is stabil maradt. Az általuk leírt transzformációs gyakoriság igen alacsony volt, más bakteriális

1. táblázat Cianobakteriális restrikciós endonukleázok

Enzim	Szekvencia specifitás	Előfordulás
Agu I /Ava I/	C↓PyCGPG	A.quadruplicatum
Mst I	TGCGCA	Micocoleus sp.
Acy I	GPu↓CGPyC	A.cylindrica
Aos I /Mst I/	TGC↓GCA	A.cylindrica
Asu I	G↓GNCC	A.subcilindrica
Asu II /Mla I/	TT↓CGAA	A.subcilindrica
Asu III /Acy I/	GPu↓CGPyC	A.subcilindrica
Ava I	C↓PyCGPuG	A.variabilis
Ava II	G↓G/ <sup>A</sup> / <sub>T</sub> /CC	A.variabilis
Ava III	A↓GCA	A.variabilis
Avr I /Ava I/	C↓PyCGPuG	A.variabilis UW
Avr II	CCTAGG	A.variabilis UW
Ast'W' I /Acz I/	GPu↓CGPyC	Anabaena sp.
Mla I	TT↓CGAA	M.laminosum

rendszerekhez képest, de több mint négy nagyságrenddel nagyobb, mint a spontán mutánsok gyakorisága.

A transzformáció hatásfoka kisebb volt azokban az esetekben, amelyekben a különböző rezisztenciával rendelkező törzseket újabb rezisztenciára transzformálták. Ennek oka feltehetően az, hogy az eritromicin és streptomycin rezisztens sejtek DNS permeabilitása különbözik a nem rezisztensektől. DNase hozzáadása nélkül a DNS felvétel szilárd táptalajon tovább folytatódott szélesztés után. Eredményeik szerint vad típusu szenzitív *Synechococcus* sejtek eritromicin rezisztenssé transzformálhatók rezisztens törzsből származó tisztított DNS-sel.

A transzformáció különlegessége a *Synechococcus* faj obligát fototróf tulajdonságával kapcsolatos. A transzformációs gyakoriság rendkívül alacsony volt, ha a sejteket transzformáció előtt sötétben tartották és az inkubációs idő alatt sem világították meg. Feltehető, hogy az aktiv DNS felvétel közvetlenül függ a fotoszintetikus energiától.

Két típusu transzformációt irt le Herdmann /1973/. Egyik a fentiekhez hasonlóan kémiaailag extrahált DNS-sel, a másik extracelluláris nukleinsavakkal történt. Donor genetikai anyagként sejtmentes filtrátumot használtak. A vizsgált *Synechococcus* törzsek mindegyike használható volt donorként és recipiensként is.

Eddig hat törzs transzformációjáról jelent meg közlemény: *A.nidulans* 602 PCC 7943 /Shestakov és Khyen, 1970/, *A.nidulans* PCC 6301 /Herdmann, 1973/, *Aphanocapsa* PCC 6714 /Astier és Espadellier, 1976/, *Gloeocapsa alpicola* PCC 6308

/Devilly és Houghton, 1977/, Agnemellum quadruplikátum PCC 7002 /Stevens és Porter, 1980/, és Synechocystis PCC 6803 /Grigorieva és Shestakov, 1982/.

### Klónozó vektorok

A cianobakteriális klónozó rendszer felé vezető első jelentős lépés egy genetikailag jelölt cianobaktérium plazmid előállítása volt.

Mivel az E.coliban használt vektorok, mint pl.: a pBR322, a transzformációs kísérletekben negatív eredményt adtak, szükségesnek mutatkozott egy belső cianobakteriális vektor létrehozása. A Nostoc PCC 7524 faj 4 Md molekulasúlyú pDU1 plazmidjának térképe alátámasztja azt a tényt, hogy az eredeti plazmidok klónozásra való felhasználása igen nehézkes. 24 restrikciós endonukleáz közül csak 8 enzimnek voltak felismerőhelyei /Reaston és mtsai., 1982/. Az egyetlen egy felismerőhellyel rendelkező endonukleáz a BglI volt, azonban a BglI felismerő szekvencia degeneratív tulajdonsága miatt ez a hely sem ideális klónozásra /Roberts, 1981/.

Az első genetikailag jelölt vektor plazmid a pUH24 volt. A.nidulans R2 törzs E.coli pRI46 plazmid transzformációja után rezisztenciára szelektálva - a pRI46 plazmid ampicillin rezisztenciát kódoló Tn901 transzpozont hordoz - az eredeti pHC24 plazmid helyett egy pHC+Tn901 rekombináns plazmidot találtak. Restrikciós enzimekkel történt emésztések és heteroduplex analízis után bizonyossá vált,



hogy az új plazmid tartalmazza a teljes Tn901 transzpozont. Az új plazmiddal történt transzformáció ampicillin rezisztenciát eredményezett, tehát a Tn901  $\beta$ -laktamáz génje a rekombináns plazmidon van és az E.coli gén A.nidulansban is expresszálódik /Van den Hondel, 1980/.

A transzformáció egyuttal bizonyítékul szolgált az E.coli plazmid felvételére is, a pRI46 plazmid a sejtekből azonban nem volt kimutatható.

A Tn901 transzpozont tartalmazó pUH24 plazmidból delécióval egy kisebb plazmidot állítottak elő, amely egy-egy klónozásra alkalmas XhoI és BamHI helyet tartalmazott. Delécióval kiesett a Tn901 transzpozon egyik vége is, így annak transzpozabilis képessége, amely a plazmid vektorként történő felhasználását megnehezítené, elveszett.

Az E.coliból származó pACYC184, pBR322 és RP4 plazmidok nem transzformálták az A.nidulans egysejtes cianobaktériumot, amely két plazmidot tartalmaz, a pUH24-et és a pUH26-ot /Van den Hondel és Van Arkel, 1980/. Az E.coli plazmidok felvétele megtörtént de ezek nem expresszálódnak és nem is maradnak fenn az A.nidulansban.

Sem a pUC, sem a pCH1 plazmid nem volt transzformálható E.coliba. Ez a tény arra utal, hogy az A.nidulans és E.coli plazmidok replikációs rendszere a heterológ gazdában nem funkcionál. Nem zárható ki az sem, hogy a transzkripció vagy transzláció szintjében vannak eltérések.

A klónozó rendszer létrehozásának következő állomását egy olyan plazmid jelentette, amely egyaránt bevihető E.coliba és A.nidulansba. Ebben a plazmidban lehetséges az A.ni-

dulans gének klónozása *Anacystis* gazdában, majd átvihetők *E.coli*-ba amplifikálás céljából és ha szükségesnek látszik a speciálisan cianobakteriális gének működésének vizsgálata ismét visszavihetők az eredeti gazdába.

Az első ilyen kísérlet során a pUC1 *A.nidulans* plazmidot és az ismert *E.coli* vektor pACYA184 plazmidot építették össze /Stüber és Bujard, 1981; Kuhlemeier, 1981/. A plazmid mindkét gazdába transzformálható volt és stabilan fennmaradt. A transzformáns kolóniákból két plazmidot sikerült izolálni, a pUC104 és a pUC195-öt. Mindkettő egy kópiában tartalmazta a cianobakteriális pUC1 és a pACYC184 plazmidot. Mindkettő molekulásúlya 8,15 Md volt, ami a két eredeti plazmid molekulásúlyának összege. Ampicillin és kloramfenikol rezisztenciát kódoltak /szilárd táptalajon 0,5 és 0,1 µg/ml/. A két plazmid csupán a pACYC184 plazmid orientációjában és az inzerció helyében különbözött. *E.coli* transzformációjuk hasonló volt a pACYC184-hez ampicillin és kloramfenikol szelekció mellett fennmaradtak, a plazmidokat vissza lehetett nyerni. Mindkét plazmid transzformálta az *A.nidulans* R-2 törzset de a transzformációs gyakoriság függött a szelekcióra használt antibiotikumtól. A jelenséget az ampicillin szelekció természete magyarázza. Az ampicillin ugyanis egy nap alatt lizálja a sejteket, a kloramfenikol gátlás pedig napok alatt fejti ki hatását. Valószínű, hogy az ampicillin megelőli a sejteket mielőtt az antibiotikum rezisztencia kifejeződhetne. Így a kloramfenikol szelekció esetén nagyobb gyakoriságú volt a transzformáció.

Ezen a különbségen túl ampicillin rezisztenciára történt sze-



lekció során egy pUC1-el azonos plazmid jelent meg az esetek 90%-ában. A maradék 10% pUC105 volt. A pACYC plazmid deléciójának ilyen nagy gyakoriságu előfordulása annak következménye, hogy *A.nidulans*-ban interakció játszódott le az eredeti pUC24 plazmid és pUC105 között. A plazmidok rekombinációja és deléció vezetett az eredeti plazmid újratelezéséhez. A pUC1 előfordulásának nagy gyakorisága arra utal, hogy *A.nidulans* gazdában ezek szelekciós előnyvel rendelkeznek a hibrid plazmiddal szemben. A pUC104 plazmidban a két nem homológ régió, a pACYC plazmid és a Tn901 transzpozon szomszédosak, itt rekombináció nem játszódott le. A pUC104 plazmid transzformációs gyakorisága eltérést mutatott a plazmid DNS származásától függően. Az *E.coli*ből származó plazmid *A.nidulans*-t 25-150-szer kisebb gyakorisággal transzformálta, mint az *A.nidulans*-ból izolált. Az eltérő transzformáció oka feltehetően a két gazda különböző postreplikációs modifikációjában keresendő.

Ezek a plazmidok rendelkeznek ugyan klónozásra alkalmas restrikciós helyekkel, de a pUC105 plazmid *A.nidulans* R2 törzsben ampicillin szelekció mellett elvesztette a teljes pACYC részét és így *E.coli*-ba nem vihető vissza. A pUC104 plazmid pedig igen kis gyakorisággal adott ampicillin rezisztens transzformánsokat.

A pBR325 kloramfenikol rezisztenciát kódoló transzpozont tartalmazó plazmiddal *A.nidulans* R2 transzformáció után sikerült egy ampicillin rezisztens kointegrátumot azonosítani, amely a pBR322  $Cm^R$  és az 5,3 Md cianobakteriális plazmidokból állt, *E.coli* és *Anacystis* gazdában repli-

kálódott és ampicillin rezisztenciát kódolt. Szilárd agaron 0,5 µg/ml folyadékkulturában 1 µg/ml ampicillin rezisztenciát mutatott *A.nidulans*-ban és 40 µg/ml-t *E.coli*-ban /Sherman és Putte, 1982/.

A vizsgált hat hibrid plazmid molekulásúlya kisebb volt, mint a két eredeti plazmid mólsúlyának összege, delécióval a pUH24 plazmid részei estek ki. A 6,8 Md plazmid mindössze két klónozásra alkalmas restrikciós hasítóhelyet tartalmazott és mert minden esetben jelen volt az R2 törzs 33 Md plazmidja, amelynek restrikciós térképe nem ismert, a rendszer ilyen formában DNS klónozásra nem alkalmas.

Ugyancsak a pUC104 plazmid alkalmazásával és a λ fág koheziv végeinek inzerciójával egy 14,2 kb méretű vektort hoztak létre, a pUC29-et. A cosmid az idegen DNS inzerciója után plazmidként viselkedik és alkalmas *E.coli* és *A.nidulans* transzformációjára, esetleg *in vitro* fágpakolással, infekcióval juttatható be a gazdasejtbe. Az első cianobakteriális klónozást ezzel a vektorral kísérelték meg.

Két gént, az *Anabaena cylindrica* PCC7120 *nif H* és *gln A* génjeit heterológ DNS hibridizációval azonosították, ezek elegendő homológiát mutatnak a megfelelő enterobakteriális génekkel /Mazur, 1980; Fisher, 1981/. *A.nidulans* R2 génbankból met/Tn901 Eco RI DNS próbával emeltek ki egy 47 kb-os rekombináns cosmidot, a pTH225-öt, amelyik tartalmazta a vad típusu Met gént. A rekombináns plazmiddal két Met<sup>-</sup> mutánst transzformáltak /*A.nidulans* R2 MET<sup>-1</sup> és *A.nidulans* 602 MET<sup>-</sup> mutánst/. Transzformáció után Met<sup>+</sup> kolóniák jelentek meg /Tandeau, 1982/.

Az *A.nidulans* MET<sup>-</sup> 1 három Met<sup>+</sup> transzformánsának elemzése kimutatta, hogy az eredeti plazmidok, a pCH1 és pUH25 is jelen voltak, de nem volt azonosítható a pTH25 plazmid. Mivel a pPUC29 /pUC104 + kohezív végek/ cosmid vektor inkompatibilis pCH1-el, valószínűleg rekombináció történt a pTU225 met DNS és a *A.nidulans* MET<sup>-</sup> 1 kromoszómális inaktivált met génje között. Hasonló eredményt mutatott az *A.nidulans* 602 Met<sup>-</sup> három Met<sup>+</sup> transzformánsa is. Az endogén plazmidok jelen voltak, de hiányzott a pTH225. A pTH225 plazmiddal együtt a transzformánsok elvesztették Ap rezisztenciájukat is.

Az *Anacystis* 6311 törzsből izolált 8 kb-os plazmidot pDF3-at /Friedber, Sheiffers, 1979/ - amely nem különbözik az *A.nidulans* R2 pUB24 plazmidjától /Van den Hondel, 1980/ és a teljes *E.coli* pBR325 plazmidot BamHI helyen összekapcsolva egy olyan hibrid plazmidot, a pDF30-at sikerült előállítani, amely egyaránt transzformálja *A.nidulans*t és *E.coli*t /Friedberg és Sheiffers, 1983/. Mindkét gazdában Cm és Ap rezisztenciát mutat, 10, illetve 1 µg/ml folyadék és 2 µg/ml szilárd kultúrában és stabilan fennmaradt. A pBR325 Tc rezisztencia génjét a pDF3 beépülése inaktiválta. A vektor XhoI, SallI, EcoRI klónozó helyeket tartalmaz. Mérete 14 kb.

Bár a rezisztencia gének *A.nidulans*ban is kifejeződnek a génexpresszió igen alacsony. Az Ap<sup>r</sup> 2-8-szorosa csak a háttérrezisztenciának. Ezért a gén aktivitását sejtmentes extraktumban igazolták in vivo β-laktamáz aktivitás mérésével.



Mivel érdekes módon a vad típusu extraktum is mutat szignifikáns Ap rezisztenciát, ez is oka lehet az alacsony szintű Ap rezisztenciának. A  $\lambda$  fágba klónozott A.nidulans gén cianobakteriális glutamin szintetáz gén expressziójának lehetőségét vetik fel E.coliban /Fischer és mtsai., 1981/. Az Anabaena glutamin szintetáz gén különböző promotereit vizsgálva megállapítható volt, hogy E.coliban a saját aktivált gluA génnel összehasonlítható szinten expresszálódik az Anabaena gén /Robinson és Haselkorn, 1983/.

#### Plazmidmentes sejtek előállítása - plazmidtörlés

Plazmidokon kódolt tulajdonságok megfigyeléséhez a géntermék elemzéséhez szükség van olyan recipiens sejtekre is, amelyek plazmidot egyáltalán nem tartalmaznak. Ilyen sejtekben a klónozott DNS hatása, működése jól tanulmányozható és a klónozott DNS izolálása könnyen elvégezhető. Nem zavar-  
nak más plazmidok restrikciós fragmentjei és az esetleges inkompatibilitás. A plazmidmentes sejtek várhatóan nem különböznek majd az eredetiektől /Lau, 1980/. Azoktól azonban igen, amelyek plazmidjai beépített genetikai markert hordoznak, pl.: antibiotikum rezisztenciát.

Régóta használnak bakteriotoxikus vegyületeket E.coli, Staphylococcus stb, plazmid és fágmentesítésére. Könnyen előidézhető az F-faktor eliminálása akridin vegyületekkel /Hirota, 1956, 1960; Ahluwalia, 1977/ és plazmidon kódolt rezisztencia elvesztése ethidiumbromid kezelés hatására /Bouchard, 1969/. A Na-dodecil-sulfát, mint felületaktiváló

szer hatékonyan eliminálta az antibiotikum rezisztens /R/ és sex /F/ faktorokat az E.coli K12 törzsben /Tomodea, 1968/ és a S.aureus pencillináz plazmidjait /Soustein, 1972/. A Na-dodecil-sulfát ismert fő hatásmechanizmusa a szelekció. A szer ugyanis toxikusabb  $F^+$  és  $R^+$ , mint  $F^-$  és  $R^-$  sejtekre. A fokozott érzékenység a sexpilusoknak tudható be /Soustein, 1972/. Fenotiazinok és dibenzoazepinek az E.coli R-faktor igen nagy gyakoriságu /15-70%-os/ elvesztését eredményezték /Molnár és mtsai., 1975/. Ezek a vegyületek gátolják a bakteriális növekedést, /Molnár és mtsai., 1975; Farkas és Molnár, 1979/ az intercelluláris plazmid transzfert és az R-faktor in vitro replikációját /Mándi és Molnár, 1981/. A vegyületek közül a dibenzoazepinek, különösen pedig az imipramin bizonyult hatékonynak /Molnár és mtsai., 1980/.

Az akridinnel rokon szerkezet miatt feltételezhető volt, hogy hatásukat a plazmid DNS replikációra interkaláció révén fejtik ki. A 174 RF DNS-en kapott eredmények alapján a klorpromazin nem volt hatással a cirkuláris DNS szupercoilra /Waring, 1970/. Nem interkalálódott az imipramin sem /Barabás, Molnár, 1979/. Ismertek viszont ezeknek a szereknek speciális membrán receptorai /Paul és mtsai., 1981; Briley és mtsai., 1979; Langer és mtsai., 1981/. Az imipramin kötődés telithető és a kötődést triciklikus vegyületek, pl. az akridin, prometazin és desipramin gátolják /Elderfrawi és mtsai., 1981/. Ezek alapján feltehető, hogy a vegyületcsoport tagjai a bakteriális sejt membránjára hatva gátolják a plazmid replikációt /Molnár és mtsai., 1983/. Ezt a hatást némileg befolyá-

solja a hőmérséklet, és optimális hatás 37°C-on érhető el, míg 20°C-on még nem volt mérhető plazmidtörlés /Molnár és mtsai., 1978/.

Az irodalmi adatokból láthatóan csak olyan klónozó vektorok állnak rendelkezésünkre, amelyeket *Anacystis nidulans*-ban használtak. Néhány esetben a pBR322 plazmid és *A. nidulans* 5,3 Md molekulásulyu plazmid véletlen összeépülésére előállított hibrid plazmid inkompatibilitás miatt eliminálódott, rezisztencia génjét elveszítette. Az *A. nidulans* és *E. coli* gazdában is stabilan fenntartható plazmid mindkét plazmidot teljes méretében tartalmazza, igen nagyméretű /14 kb/, ennek ellenére csak 3 klónozó hellyel rendelkezik. A pBR325 plazmidból származó Ap<sup>r</sup> gén expressziója igen alacsony, csak kétszerese a háttérrezisztenciának. A gének kölcsönösen expresszálódnak mindkét gazdasejtben de igen alacsony szinten, ami a két baktériumfaj különbözőségéből adódik /heterotróf, autotróf/.

A hibrid vektor amúgy is nehézkes használatát tovább nehezítették az *Anacystis nidulans* R2-ben lévő plazmidok, amelyek inkompatibilitás miatt a vektor elvesztését vagy rekombinációját idézték elő, a deléció egy esetben a teljes pBR322 plazmid és a genetikai markerek elvesztését okozta. Az *A. nidulans* 33 kb ismeretlen plazmidja a restrikciós elemzéseket zavarta, a vektor plazmid visszanyeréséhez minden esetben egy újabb lépést - cukorgrádiensen való tisztítást is be kellett iktatni a plazmidtisztítás amúgy is hosszú folyamatába, esetleg agaróz gélből kellett izolálni a különböző plazmidokat.

## CÉLKITÜZÉS

Fotoszintézis és nitrogén fixálás szempontjából jelentős, de molekuláris biológiai szempontból kevésbé ismert cianobaktériumok génszinten történő vizsgálatában minőségi változást hozhat a rekombináns DNS rendszer kidolgozása.

Munkám céljául egy DNS klónozó rendszer felállítását tűztem ki. Az egyes feladatok a következőkben foglalhatók össze.

1. A cianobaktériumok transzformációjára reprodukálható módszer kialakítása.
2. Az egysejtes és fonalas cianobaktérium fajok ismeretlen plazmid DNS-ét tisztán előállítani és restrikciós enzimekkel elemezni.

3. Alkalmos kisméretű cianobaktérium plazmid és egy

*Escherichia coli* plazmid összeépítésével mindkét gazdában replikálódó hibrid vektor plazmidot hozni létre, amellyel kiaknázhatók a jól ismert *E. coli* klónozó rendszer előnyei, génexpresszió vizsgálatára pedig a vektor visszavihető a cianobaktérium gazdába.

4. Kivánatos egy recipiens cianobaktérium törzs létrehozása, amely nem tartalmaz plazmidot.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Baktérium törzsek és plazmidok

Az Anacystis 44 törzs az An6301 jelű egysejtes cianobaktérium törzsből származik, egyik plazmidját elvesztette és csak a 33 Md molekulásulyu plazmidot tartalmazza /Lau és Doolittle, 1979/. Az Anacystic M4<sup>-</sup> törzs az R2-es származéka, SDS curing során elvesztette 5,2 Md plazmidját.

Az Anacystis S9 törzs egy 5,2 és 36-39 Md plazmidot tartalmaz. Előállításához R2-t pRT646 plazmiddal transzformáltak, a kapott Sm rezisztens kolónia /S4/ 4 plazmidot tartalmazott 5,2, 10,5 33 és 36-39 Md molekulásulyut /Hondel, 1979/. Az izolált plazmidokkal újra transzformálták az R2 törzset, az eredmény egy Sm<sup>R</sup> telep volt, amely az 5,2 és 36-39 Md plazmidokat tartalmazta.

## Anacystis plazmidok

pUH24 - 5,2 Md

pUH25 - 33 Md

pCH7 - 36-39 Md /pUH25 + Ap<sup>r</sup> és Sm<sup>r</sup> gén  
inszerció/

pCH6 - 10,5 Md /pUH24 + Ap<sup>r</sup> és Sm<sup>r</sup> gén  
inszerció/

Az Anacystis törzsek és plazmidok a 2. táblázatban összefoglalva találhatóak.



2. táblázat *Anacystis nidulans* törzsek és plazmidok

Anacystis törzs	Plazmid molsulya x10 <sup>6</sup> d.	Plazmid jele	Eredete	
1	44	33	pUH25	
2	M4	10,5	pHCH6	pUH24 + Ap <sup>r</sup> és Sm <sup>r</sup> insertio
3		33	pUH25	
3	S2	5,3	pUH24	
		33	pUH25	
		36-39	pCH7	pUH25 + Ap <sup>r</sup> és Sm <sup>r</sup> insertio
4	S9	5,2	pUH24	
		36-39	pCH7	
5	S19	10,5	pCH6	pUH24 + Ap <sup>r</sup> és Sm <sup>r</sup> insertio
6		33	pUH25	
			pUH25	
6	6301	5,2		
		33		
7	A6	5,3		
		33		
8	602	5,3		
		33		
9	R2	5,3		
		33		
10	UC21	6,5		
		33		
11	S21	5,0		
		33		
12	S22	5,2		
		33		

E.coli törzsek és plazmidok

E.coli K12, HB101 /pro<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> r<sup>-</sup> m<sup>-</sup> Sm<sup>r</sup>  
endoI<sup>-</sup> recA<sup>-</sup>/

/Boyer és Roulland-Dussoix, 1969/

E.coli K12 LE140 F<sup>'</sup>lac

Plazmidok: pBR322 /Sutcliffe, 1978/

RP4 Ap<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> /Datta, 1971/

pHC624 Ap<sup>r</sup> /Boros J., személyes közlés/

Táptalajok

LB: Bacto-tryptone	10 g
Yeast-extract	5 g
NaCl	10 g literenként, pH 7,5
YTB: NaCl	50 g
Trypton	10 g
Yeast-extract	1 g literenként, pH 7,2

BG 11 - tápfolyadék összetétele a 3. táblázatban látható.

Tenyésztési körülmények

Az Anacystis sejteket BG11 tápfolyadékban tenyésztettük  
/Stamler és mtsai., 1977/.

A tenyészeteket 50 ml BG11-et tartalmazó 250 ml-es  
Erlenmayer üvegekben neveltük 26-28°C-on folyamatos rázás  
közben. Az exponenciális növekedési fázisban lévő törzs-  
tenyészet 5-10 ml-ével inkubáltuk a 4 l-es kulturákat.

3. táblázat A BG11 táptalaj összetétele

A. Oldat		B. Oldat	
NaNO <sub>3</sub>	30.000 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,80 g	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,81 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,50 g	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,223 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,72 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,3 g
citromsav · H <sub>2</sub> O	0,13 g	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,079 g
ferri ammóniumcitrát	0,12 g	Co/No <sub>3</sub> / <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,049 g
E.D.T.A.	0,02 g	1 liter demineralizált vízben	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> · 10H <sub>2</sub> O	10,80 g		
B oldat	20,00 ml		
20 liter demineralizált vízben			
pH 7,5			

Ezek 5 literes edényekben nőttek 26-28°C-os vízfürdőn állandó keverés mellett. A folyadékban 5% CO<sub>2</sub> tartalmu, N<sub>2</sub> gázt buborékoltattunk át. A kulturák sejtszáma 2-4 x 10<sup>8</sup> sejt/ml volt az exponenciális fázis végén, amikor a sejteket plazmid DNS tisztításra összegyűjtöttük.

A Pseudomabaena 6301 sejteket Allen tápfolyadékban szaporítottuk és agart tartalmazó Allen lemezekben tartottuk fent szobahőn /Allen, 1968/.

### Plazmid DNS tisztítása

#### RP4 plazmid DNS tisztítása

Ferde agarról 50 ml LB tápfolyadékot ~~ink~~ inkubáltunk RP4 plazmidot tartalmazó E.coli sejtekkel. A tápfolyadék 50 µl/ml Ap-t és 25 µg/ml Sm-t tartalmazott /Datta, 1971; Barth, 1978/. Egy éjszakán át inkubáltuk, majd 20 ml-ével 1 liter LB tápfolyadékot oltottunk be és 37°C-on 12-16 óráig át tenyésztettük.

A sejteket lecentrifugáltuk, és 250 ml 0,12 M NaCl és 0,05 M EDTA /pH 8,0/ oldattal átmostuk. Centrifugálás után 8 ml 0,05 M Tris /pH 8,0/ 25% szacharóz oldatban szuszpendáltuk 9 ml végtérfogatban.

1,8 ml 8 mg/ml lizozimot adtunk a sejtszuszenzióhoz, 10 percig szobahőn inkubáltuk, majd 3,6 ml EDTA /pH 8,0/ jelenlétében 15 percig állni hagytuk, végül 14,4 ml Brij oldatot adtunk az elegyhez /1% Brij, 0,4% DOC, 0,05 M Tris, 0,06 M EDTA pH 8,0/, amelyet 30 perc után centrifugáltunk /27 000 rpm, 30 perc, Sorvall centrifuga/. A felüluszt Sw27 csövekbe ön-

töltük, és ml-enként 1 g CsCl-ot adtunk hozzá, végül 8 ml 5 mg/ml etidiumbromid oldattal feltöltöttük a csöveket. Vertikális Ti50 rotorban Beckmann centrifugában 45 000 rpm-el 20 órán át centrifugáltuk. Az elkülönült plazmid DNS-t tartalmazó frakciót alkohollal csaptuk ki. A csapadékot 250-500 µl TE pufferben oldottuk.

#### Nagy mennyiségű plazmid DNS tisztítása

10 ml YTB vagy LB antibiotikumot tartalmazó tápfolyadékot izolált baktérium teleppel inkubáltunk, éjszakán át erős rázatás mellett növesztettünk. Majd 2 l-es üvegekben 500 ml antibiotikumos tápfolyadékot oltottunk a fenti stater 10-15 ml-ével.

0,4 OD baktériumsűrűségnél 170 µg/ml végkoncentrációban klo-ramfenikolt adtunk a tenyészetéhez, majd további 12-16 órán át inkubáltuk.

A sejteket 4 000 g-vel 10 percig centrifugáltuk 4°C-on. Az üledéket hideg 0,1 M-os NaCl, 10 mM Tris-HCl /pH 7,8/ és 1 mM EDTA elegyével átmostuk. Centrifugálás után 50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl /pH 8,0/ és 10 mM EDTA-t tartalmazó oldat 10 ml-ében oldottuk, az oldathoz 5 mg/ml lizozimot adtunk.

Rövid állás után /30 perc/ 20 ml friss hideg 0,2 N NaOH 1% SDS oldatát adtuk hozzá, majd 15 ml hideg K-acetátot /pH 4,8/ tartalmazó oldatot, amelyet a következőképpen állítottunk össze.

60 ml 5 M K-acetát, 11,6 ml jégacet és 28,5 ml viz. Keverés után 10 percig jégen állt az elegy. Ezt követően 20 percig

18 000 rpm fordulattal 4°C-on Sorvall centrifugában lecentrifugáltuk.

A felülszót alkohollal átmostuk, kicsaptuk, az üledéket szárítottuk, 8 ml TE-be oldottuk és egyensúlyi CsCl etidiumbromid grádiensen 48 órán át centrifugáltuk 38 000 rpm-nél. A plazmid DNS-t tartalmazó frakcióból butanollal eltávolítottuk az etidiumbromidot, majd TE-val szemben dializálva a CsCl-ot.

#### Gyors plazmid DNS tisztítása alkalikus lizissel

Izolált teleppel 3-5 ml antibiotikumot tartalmazó YTB tápfolyadékot inokuláltunk s 37°C-on 16 órán át növesztettük. Centrifugáltuk /4 000 rpm, 10 perc/, a csapadékot 100 µl hideg I. pufferben oldottuk /500 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 8,0/.

Eppendorf csövekbe vittük át az oldatot és a fenti pufferben oldott 40 mg/ml lizozim oldatból 10 µl-t adtunk hozzá, 5 perc után 200 µl friss, hideg II. puffert /0,2 N NaOH, 1% SDS/ adtunk, a csöveket 2-3-szor megforgattuk, 5 percre jégre tettük, majd 150 µl jéghideg 3 M K-acetáttal /pH 4,8/ összekevertük, további 5 percig jégen hagytuk.

Lecentrifugáltuk, a felülszót új eppendorf csőbe raktuk. Azonos térfogatu fenol-kloroform elegyével extraháltuk, a fenolt kloroformmal távolítottuk el. Alkoholos kicsapás után a csapadékot 70%-os alkohollal mostuk, a DNS-t 50 µl TE-ben oldottuk, 0,1-0,2 µg/µl RNáz enzimet adtunk az oldathoz, ennek 10 µl-e restrikciós emésztésekhez használható, a többi -20°C-on tároltuk.

A plazmid DNS preparátum kromoszómális DNS-sel és kis molekulású nukleinsavakkal szennyezett, de restrikciós analízisekhez kielégítően tiszta volt.

#### Gyors módszer cianobakteriális plazmid izolálásra

Teljes növekedésben lévő kultúra 0,5 ml-ével inokulált tenyészeteket három-négy napig fényen növesztünk 50 ml BG11 folyadék táptalajban  $1-2 \times 10^8$  sejt/ml végső sejtkoncentrációig.

Hasznos lehet a kultúra 5 ml-ét az izolálás megkezdése előtt sterilén továbbra is fényen tartva eltenni, ha ugyanis az izolálás megfelelő eredményt hoz, ezzel késedelem nélkül indíthatunk újabb tenyészeteket.

A kultúra többi részét lecentrifugáltuk SS 34 centrifugacsövekben /10 perc, 10 000 rpm-en, 4°C Sorvall centrifuga/. A felülusztót kiöntve a visszamaradó sejteket először 10 ml 0,12 M NaCl /0,05 M EDTA, /pH 8,0/ pufferben/ szuszpendáltuk, újabb centrifugálás után pedig 10 ml lizispufferben: /50 mM glükóz, 25 mM Tris, 10 mM EDTA /pH 8,0/. Centrifugálás után a felülusztót eltávolítottuk, a sejteket a csőben maradt összefolyó lizispufferben felszuszpendáltuk, 0,5 ml térfogatra feltöltöttük és Eppendorf centrifugacsövekbe tettük.

A sejtszuszpenzióhoz 0,25 ml frissen készített 10 mg/ml koncentrációjú lizozim oldatot adtunk, és 37°C vízfürdőben inkubáltuk, egy óra eltelte után 0,25 ml ugyancsak frissen készített 10%-os SDS oldat 0,25 ml-ét hozzáadva továbbra is 37°C-on tartottuk és újabb egy órás inkubálás után 0,25 ml

5 M-os NaCl-t adtunk hozzá. Kb. 30 percig finoman forgatva kevertük és legalább 12 órán át 4°C-on tároltuk. /Ebben az állapotban napokig, hetekig tárolhatjuk az oldatot./

Eppendorf centrifugában 30 percen át centrifugáltuk az oldatot 4°C-on. A zöld felüluszó /kb. 1 ml/ tartalmazza a DNS-t, amit fenolos extrakcióval nyerhetünk ki. 0,5 ml T/O,1 E-vel telített fenolt adtunk az oldathoz, amit alapos keverés után 10 percig centrifugáltunk, ugyancsak Eppendorf centrifugában. A csőben zöld üledéket találtunk, egy vékony zöldes fenolréteget, amely a DNS-t tartalmazza. Az extrakciós lépést a felső vizes fázissal még kétszer megismételtük.

A vizes fázisban maradt fenol teljes eltávolítására a kb. 0,5 ml oldathoz adtunk 0,5 ml-t kloroform és izoamil-alkohol 24:1 arányu elegyéből. Alapos keverés és centrifugálás után a tiszta felső vizes fázist 5 W 50 poliallumer csőbe vittük, ahol még 0,15 ml 3 M nátrium acetátot /pH 5,6/ és 0,35 ml T/O,1 E-t adtunk hozzá. Az elegyet nagyon gondosan elkevertük és a csövet 96%-os etanollal feltöltöttük.

A csövet -70°C-on legalább 30 percig, vagy -20°C-on legalább 12 órán át tároljuk, utána 30 000 rpm-el 15 percig 4°C-on centrifugáltuk. Leöntöttük a felüluszt a csapadékot pedig 30 percig exikátorban szárítottuk. Utána a csapadékot 100 µl T/O,1%-ban szuszpendáltuk legalább 1 órás keveréssel 4°C-on. A pufferhez előzőleg 50 µg/ml RNase-t adtunk. A kész plazmid mintát 0,6%-os agaróz gélben elemeztük.



Cianobaktérium plazmid izolálás 4 l-es kulturából

A 4 l BG11 folyadéktáptalajt az exponenciális növekedésben lévő törzstenyészet 5 ml-ével inokuláltuk. A kultúrát 4-6 napig 37°C-os vízfürdőben tartottuk, amíg el nem érte a  $2-3 \times 10^8$  sejt/ml sűrűséget. Akkor 500 ml-es GS 3 csövekben Sorvall centrifugában lecentrifugáltuk a sejteket /7 000 rpm, 4°C, 10 perc/.

Az újabb centrifugálás előtt a sejteket átmostuk 250-250 ml 0,12 M NaCl /0,05 M EDTA pufferrel /pH 8,0/.

Centrifugálás után lizis pufferben szuszpendáltuk a sejteket, a végső térfogatot 90 ml-re töltöttük fel és 6 db Beckman R 30 centrifugacsőbe osztottuk szét. Csövenként 1 ml lizozim oldatot adtunk hozzá, úgy, hogy a végkoncentráció 2 mg/ml legyen. Gondos keverés után a csöveket 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, amikor is 3 ml frissen készített 10%-os SDS oldatot adtunk minden csőhöz. A csövek tartalmát forgatva elkevertük és további 1 órán át inkubáltuk, ugyancsak 37°C-on. Végül 5 ml 5 M-os NaCl-t adtunk az oldatokhoz, és legalább 12 órán át 4°C-on tároltuk őket. Az oldatok ebben az állapotban napokig, sőt hetekig eltarthatóak 4°C-on.

Következő lépésként az oldatot lecentrifugáltuk /30 perc, 4°C, 25 000 rpm Sorvall centrifuga/. A DNS-t tartalmazó felüluszóhoz csövenként 10% PEG-et adtunk, az oldatot alaposan elkevertük és 12 órán át 4°C-on tartottuk, utána 10 percig 5 000 rpm-en lecentrifugáltuk és a csapadékot 4 ml pufferben /10 mM Tris/0,1 mM EDTA, pH 7,5/ oldottuk fel 4°C-on. Az oldatot 5 W 27 cellulóznitrát csőbe vittük, ahol 26,7 g oldathoz 28,7 g CsCl<sub>2</sub>-t adtunk és végül 3 ml

etidium bromiddal /5 mg/ml/ feltöltöttük a csövet, amit azután 20 órán át centrifugáltunk, 45 000 rpm-nél, vertikális 50 Ti Beckman rotorban.

UV fényben nézve a plazmid és kromoszómális DNS sávja jól elkülönül. A cellulóznitrát csövet alul injekciós tűvel kiszurtuk és a plazmid DNS sávot összegyűjtöttük. Az alkoholos precipitációhoz a 3 ml plazmid DNS-t tartalmazó frakcióhoz 1,2 ml 1%-os sarkosilt, 1,2 ml 3 M nátriumacetátot /pH 5,6/ 6,6 ml T/0,1 E-t adtunk, majd a csövet feltöltöttük, kb. 24 ml 96%-os alkohollal és az oldatot egy éjszakán át  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. A plazmid DNS-t centrifugálással lehet összegyűjteni /30 perc, 24 000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ /. A csövekből kiöntöttük a felüluszt és tökéletesen megszáritottuk az üledéket. A csövek alján összegyűlt DNS-t 200  $\mu\text{l}$  T/0,1 E pufferben oldottuk. A minta 20-25  $\mu\text{l}$ -ét 0,6%-os agaróz gélen vizsgáltuk. Az  $5,3 \times 10^6$  és a  $33 \times 10^6$  dalton molekulasulyu plazmidok elkülönítésére a mintákat cukor grádiensre vittük. A felhasznált oldatok összetétele a 4. táblázatban található.

#### Cianobaktériumok transzformációja

Cianobaktérium sejteket 3-4 napig 50 ml BG11 oldatban fényen folyamatosan rázva növesztettünk  $2 \times 10^8$  sejt/ml sejtsűrűségig.

A szuszpenzió 10 ml-ét  $20^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig 10 000 rpm-en SS 34 csövekben/ lecentrifugáltuk. Az üledéket 0,1 M



## 4. táblázat

Oldatok és pufferek plazmid izoláláshozLizis\_puffer

100 ml 0,5 M Tris pH 8,0

200 ml 0,25 M EDTA pH 8,0

200 ml 60 5 sucrose

/100°C-on 30 percig sterilizálva/

Lizozim\_oldal

33 mg lizozim

4 ml 0,25 M EDTA pH 8,0

2 ml 0,5 M Tris pH 8,0

4 ml 60 5 sucrose

Etidium\_bromid\_puffer

0,4 M Tris

0,05 M Na acetát pH 5,0

0,01 M EDTA

a pH-t 7,8-ra állítjuk be

0,02 mg/ml etidium bromid

T/0,1\_E

0,01 M Tris

0,1 M EDTA

pH 8,0

MgCl<sub>2</sub> és 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-el átmostuk és újra centrifugáltuk. Bürker kamrával megállapítottuk a sejtszámot, higitással 5 x 10<sup>8</sup> sejt/ml-re állítottuk be. A sejtszuszpenziót üvegcsövekbe vittük és milliliterenként 1 µg DNS-t adtunk hozzá. A kontroll csövekhez BG 11 azonos mennyiségét adtuk. A sejteket fényen 28°C-on inkubáltuk 30-45 percig. Higitási sorozatot készítettünk, hogy jól számolható kolóniákat kapjunk az agarlemezen /0,1 ml-t szélesztünk 1%-os agart tartalmazó BG 11 lemezeken/.

Az antibiotikumot 24 óra után a finoman felemelt lemez alá pipettáztuk. Az antibiotikum végső koncentrációját az agar térfogatával együtt kell érteni.

A lemezeket melegszobában fényen 6-12 napig hagytuk nőni. Az izolált rezisztens transzformáns és kontroll lemezeken megjelenő spontán mutánstelepekből 1,5 ml BG 11 folyadéktáptalajt inokuláltunk. Ezeket üveg kémcsövekben a fentiekben leírt körülmények között 4-6 napig nőni hagytuk. A tápfolyadék természetesen tartalmazta a kívánt antibiotikumot is.

Antibiotikumból a szilárd táptalajon használt koncentrációnak csak a felét adtuk a kulturához, még így is sok sejt elpusztult a két táptalaj különbsége miatt.

A feltehetően rezisztens telep 1,5 ml-es folyadéktenyészetéből 10<sup>-5</sup> higitást készítettünk, ezt antibiotikumot tartalmazó szilárd táptalaj felületére szélesztettük /0,1 ml/lemez/.

Az egyes kolóniákat egymástól elkülönítettük és felnevelve ezekből izoláltunk plazmidot. Az eredeti telepek ugya-

nis a sokáig elhuzódó, még szélesztés után is folyó DNS felvétel miatt különböző sejteket tartalmazhatnak. Legvégül ennek izolált plazmidjait transzformációs kísérlettel ellenőriztük.

### E.coli transzformáció

50 ml YTB tápfolyadékot friss kultúra 1 ml-ével indukáltunk.

0,5 OD-ig növesztettük majd gyorsan lehűtöttük. Sterilen lecentrifugáltuk a sejteket. Hideg 0,1 M-os  $MgCl_2$ -al, majd 0,1 M  $CaCl_2$ -vel mostuk át őket.

Egy óra állás után 0,2 ml-ként csövekbe osztottuk a szuszpenziót és hozzáadtuk a transzformáló DNS-t 0,5  $\mu g/ml$  mennyiségben. 1 óra jeges hűtés után 2 percig  $42^\circ C$ -on hőindukáltuk, amit jégen való hűtés követett. Majd csövenként 1 ml YTB-vel 1 órán át  $37^\circ C$ -on rázattuk a tenyészeteket. Ez a rezisztencia génnek kifejeződéséhez kell.

Centrifugálás után a sejteket YTA lemezre szélesztettük, a lemezek a megfelelő antibiotikumot tartalmazták.

### $P^{32}$ -jelölt plazmid DNS előállítása

A pBR322 plazmid DNS-t nick transzlációval /Maniatis, 1983/ jelöltük.  $2-5 \times 10^6$  cpm/30  $\mu g$  specifikus aktivitásra higitottuk pBR322 DNS-el. 1  $\mu g$  DNS/50  $\mu l$  koncentrációban használtuk.

### H<sup>3</sup>-imipramin kötődés meghatározása

1,0 x 10<sup>9</sup>/ml sejtszámu E.coli K12 LE104 F'lac és HB101 YTB baktérium kulturákat használtunk. 750 µl baktérium kulturát 50 µl H<sup>3</sup>-imipraminnal inkubáltunk, a megfelelő koncentrációban. A puffer 0,005 M Tris HCl-t pH 7,4, 0,05 M NaCl-t és 0,005 M KCl-t tartalmazott /Briley és Langer, 1981/.

A Dezipramin, prometazin, akridin orange és metilénkék oldatokat hasonlóan készítettük el.

0°C-on 60 percig tartó inkubálás után 100-500 µl-es részleteket higitottunk 5 ml hideg Tris-HCl pufferrel és gyorsan átszűrtük Whatman GF/F szűrőn.

A szűrőket hideg pufferrel 3-szor átmostuk, szárítottuk, a radioaktivitást 5,0 ml scintillációs folyadékban mértük /5,0 g PPO, 0,12 p POPOP, 1.000 ml toluolban/ Packard-Tricarb spektrométerben 1,0 percig. Triciklikus vegyületek H<sup>3</sup>-imipramin felvételre kifejtett hatását E.coli K12 F'lac sejteken vizsgáltuk.

A vegyületeket 10<sup>-4</sup> M koncentrációban adagoltuk a H<sup>3</sup>-imipramin hozzáadását megelőzően.

### Membrán vezikulák preparálása

2 x 500 ml MTY-tápfolyadékban 37°C-on neveltük a baktériumokat. A vezikulákat French press-el készítettük 8.000 Psi nyomáson /Rosen és Tsuchya, 1979/. Ez az eljárás fordított orientációjú vezikulákat eredményezett.

A membrán preparátum fehérjetartalmát meghatároztuk /Lowry, 1951/ és a kívánt koncentrációra higitottuk.

P<sup>32</sup>-pBR322 DNS membrán kötődésének meghatározása triciklikus vegyületek jelenlétében

P<sup>32</sup> plazmid DNS fordított orientációjú membrán vezikulákhoz való kötődését  $3 \times 10^{-5}$  M klórpromazin, 7,8-dioxo-klórpromazin, imipramin metilénkék és telített imipramin jelenlétében mértük. 0°C-on 0,05 M Tris-HCl pufferben /pH 7,4/. A membrán oldatot 1,0 mg protein/ml-re hígítottuk.

100 µl membrán oldathoz 350 µl hideg pufferben adtuk a vegyületeket. 5 perc inkubálás után 1,0 µg P<sup>32</sup>-DNS-t adtunk minden mintához, 20 perc után 5,0 ml Tris-HCl pufferrel együtt Millipore HAWG 0,45µ filteren átszűrtük.

2 x 5 ml hideg pufferes mosással eltávolítottuk a nem kötött DNS-t. A filtereket 37°C-on 20 órán át szárítottuk a minták radioaktivitását 5,0 ml scintillációs folyadékban Packard-Tricarb spektrométeren 1 percig mértük.

DNS minták gélelektroforézise

A plazmid DNS-ek és a restrikciós fragmentek elválasztása agaróz gélelektroforézissel történt, a gélek 0,4-1% agarózt tartalmaztak. 50 mM Tris, 20 mM Na-acetát pH 8,05, 20 mM EDTA összetételű pufferben, horizontálisan 6-10 V/cm feszültségen.

DNS kimutatására a géleket 0,5 µg/ml vízben oldott etidiumbromiddal 5-10 percig festettük, a nem specifikusan kötött etidiumbromidot vízzel mostuk ki, 5-10 percig.

A mintákat 250-360 nm UV fényel megvilágítva értékeltük.

DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal

Az egyes restrikciós endonukleázokhoz gyárilag megadott puffereket használtunk; 20  $\mu$ l végtérfogat 2-4 egység enzimet, 1-2  $\mu$ g DNS-t tartalmazott.

Az inkubációs idő 1-4 óra volt 37°C-on /Maniatis, 1982/. Többszörös emésztéseknél ha a második enzim reakciókörülményei eltérőek voltak, fenol-kloroformmal fehérmentesítettük az elegyet.

DNS fragmentumok összekapcsolása polinukleotid ligázzal

A restrikciós enzimekkel hasított ragadós vagy tompa végű DNS darabokat T4 fággal fertőzött E.coli sejtekből származó ligáz enzimmel kapcsoltuk össze. A 20  $\mu$ l végtérfogatu elegy 2  $\mu$ l 10-szeres ligáz puffert /700 mM Tris-HCl pH 7,6 és 100 mM MgCl<sub>2</sub>/, 2  $\mu$ l 2 mM ATP-t, 2  $\mu$ l 100 mM DTT-t a DNS darabokat /0,5-2  $\mu$ g/ és 1  $\mu$ l T4 ligázt 610 egység/ $\mu$ l/ tartalmazott. A reakció 2-4 órán át 14°C-on történt.

Plazmidmentes sejtek előállításaPlazmidtörlés SDS-el

10 mg/ml streptomycin jelenlétében tenyésztett 10<sup>8</sup> sejt/ml koncentrációju sejtkulturával 10<sup>3</sup> sejt/ml végső koncentrációval számolva 50 ml BG 11-et inokuláltunk.

Hat párhuzamos kulturát indítottunk, amelyek antibiotikumot nem, de 0, 3, 4, 5, 6, 7 x 10<sup>-3</sup>% SDS-t tartalmaztak.



A sejteket  $37^{\circ}\text{C}$ -on megvilágítva állandó rázás közben neveltük. Azokat, amelyek a legmagasabb koncentrációju SDS jelenlétében látható sejtnövekedést mutattak,  $10^8$  sejt/ml sejt-koncentrációig neveltük, majd streptomicint nem tartalmazó szilárd táptalaj felületére lemezenként, kb. 400 sejtet szélesztettünk. Ezt a mester lemezt a kolóniák kialakulása után két száraz lemezre replikáztuk. Az egyik 10 mg/ml streptomicint, a másik csak BG 11-et tartalmazott. Ujabb növekedési idő után ki kellett választani azokat a kolóniákat, amelyek az Sm tartalmu táptalajon nem nőttek. A rezisztencia elvesztése valószínűleg a plazmid elvesztésének következménye. Ellenőrizni kellett azonban, hogy a sejtek valóban plazmidmentesek-e. A szenzitív kolóniával egyidejűleg folyadéktáptalaj kis mennyiségét egy antibiotikum nélküli és egy antibiotikumot tartalmazó lemezt egy-egy csikban inokuláltunk. Ez volt a rezisztencia újabb tesztje.

Azokból, amelyek itt is streptomicin szenzitívnek bizonyultak, plazmidot izoláltunk, hogy eldöntsük, vajon a kívánt eredményt, a plazmidmentességet hozta-e a curing.

#### Plazmidtörlés fenotiazinokkal

Pseudanabaena 6309 sejtek 3-4 napos folyadéktenyészetének 2-5  $\mu\text{l}$ -éhez 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban imipramint és pronetamint adtunk. Megfigyeltük a sejtek túlélését 24, 48 óra és 10 nap után.

Meghatároztuk azt a koncentrációt, amelyet a sejtek még túlélnek /MIC=minimal inhibitory concentration/.

Imipramin esetében 5 µg/ml, prometamin esetében 10 µg/ml koncentrációban adtuk a folyadékkulturában lévő, 3-4 napja növekvő sejtekhez. 24 óra inkubálási idő után a sejteket szilárd táptalajra szélesztettük, az izolált telepekből 5 ml folyadékkulturát inokuláltunk s ezekből plazmidot tisztítottunk.

## A KISÉRLETEK LEIRÁSA ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELESE

Anacystis fajok plazmidjai

Pseudanabaena 6301 és Anacystis fajok plazmidjait tisztítottunk és elemeztünk.

A gazdasejt lizisét követően centrifugálással eltávolítottuk a sejtalkotókat és a kromoszómális DNS-t. A tisztított lizátumot etidiumbromidot tartalmazó CsCl-ban centrifugáltuk /Radloff, 1969/. A vizsgált törzsek mindegyike több plazmidot tartalmazott. A plazmidok molekulasúlyát agaróz gélelektroforézissel határoztuk meg. Molekulasúly markerként Synechococcus 7002 plazmidokat használtunk, ezek molekulasúlya: 3; 6,5; 10,3; 20,1; 24,7; és 75 Md.

A 33 és 36-39 Md plazmidokkal végzett munkákhoz az RP4 plazmidot használtuk. Ez eredetileg P.aeruginosa plazmid, amelyet E.coli K12-ben szaporítottunk fel, molekulasúlya 36 Md /Datta, 1971; Hedges, 1976; Barth, 1978/.

Az Anacystis plazmidok jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza.

Az Anacystis S9 36 Md plazmid restrikciós elemzése

Az 5,3 Md pUH24 plazmid ampicillin rezisztencia gént hordoz és elvileg alkalmas klónozásra /Hondel, 1980/.

Munkáink során ebből az eredményből kiindulva próbáltunk létrehozni egy másik cianobakteriális vektort a 36 Md molekulasúlyú plazmidból. A két kompatibilis plazmidot használva fel a vek-

torok készítéséhez feltételeztük, hogy a vektorok is kompatibilisek lesznek. Az S9 törzs pRT 646 Sm<sup>r</sup> plazmiddal törént többszörös transzformáció és szelekció útján állt elő a 36 Md plazmid, ebből tehát egy olyan kisméretű plazmidot próbáltunk létrehozni, amelynek replikációja érintetlen, a restrikciós endonukleázoknak 1-1 felismerőhelyét tartalmazza, és antibiotikum rezisztenciát kódol. Az új plazmid rezisztenciája révén szelekciós előnybe kerül és inkompatibilitás alapján eliminálja az eredeti 33 Md plazmidot. Több plazmid jelenléte igen megnehezítette a restrikciós enzimekkel történő elemzéseket. A nagy plazmidot nehéz kezelni, térképezése körülményes és kis hatásfokkal transzformálható. A plazmid tartalmaz egy inszercióval beépült streptomycin gént. A rezisztencia gén és az esszenciális régió megőrzése mellett kellett a plazmid méretét minimálisra csökkenteni. Az előzetes kísérletek és az irodalmi adatok alapján /Lau, 1978; Hondel, 1979/ olyan restrikciós endonukleázokat kerestünk, amelyeknek kevés felismerőhelyük van a plazmid DNS-en. Két ilyen enzimet találtunk, a XhoI, amely 3 és a SallI, amely 2 helyen hasítja a DNS-t.

A plazmid XhoI emésztése 4 fragmentumot eredményezett 16; 7,15; 2,95 és 1,65 Md, a SallI emésztés pedig hármat 16,0; 5,9 és 5,2 Md. A fragmentumok molekulaszúlyát HindIII emésztett  $\lambda$  DNS mellett határoztuk meg.

A plazmidot XhoI endonukleázzal emésztettük és a DNS fragmentumokat ligáltuk. Majd a többféle kombinációban keletkezett rekombináns molekulákkal streptomycin-szenzitív *Synechococcus* R2-t transzformáltunk.



Streptomycin rezisztenciára szelektálva olyan transzformánsokat kaptunk, amelyekben a plazmid hordozta a rezisztencia gént. Az *Anacystis* az *E.coli*hoz viszonyított lassu növekedése miatt figyelmünk egy olyan lehetőségre irányult, amely egy hibrid vektor által lehetővé tenné a cianobakteriális plazmidok és *E.coli* plazmidok kölcsönös transzformációját, és a cianobaktérium plazmidjainak amplifikálását *E.coli*ban. Eredendően kis mérete miatt a *Pseudanabaena* PCC 6903 plazmiddal kezdtük meg ezeket a munkákat.

#### A *Pseudanabaena* PCC 6903 törzs plazmidjai

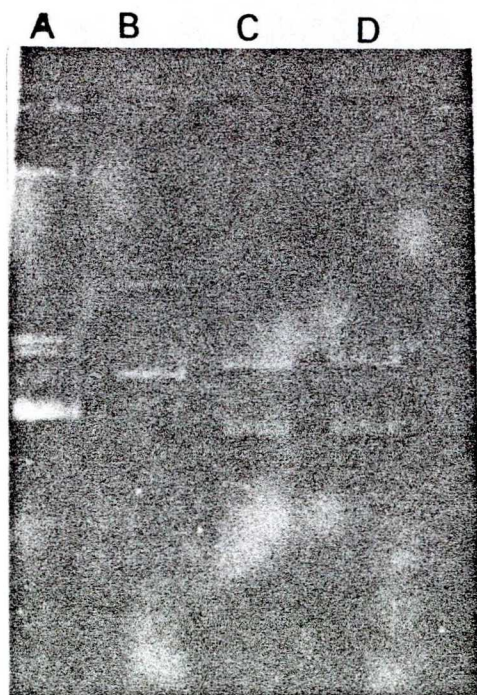
A *Pseudanabaena* 6903 törzs két plazmidot tartalmaz, pPA 6903-1 és pPA 6903-2-t, ezek egymáshoz nagyon közeli molekulasúlyúak. Méretük 2.050 és 1.900 bp.

Mivel a plazmidok agaróz gélben történő elválasztása és izolálása nem volt megbízhatóan elvégezhető, felhasználásukra egy célravezetőbb módszert alkalmaztunk. A két plazmidot együtt restrikciós enzimekkel emésztettük. Az 1. ábra egy ilyen emésztést mutat, az intakt plazmidok mellett ezek BglIII, HindIII, valamint BglII, HindIII kettős emésztése látható.

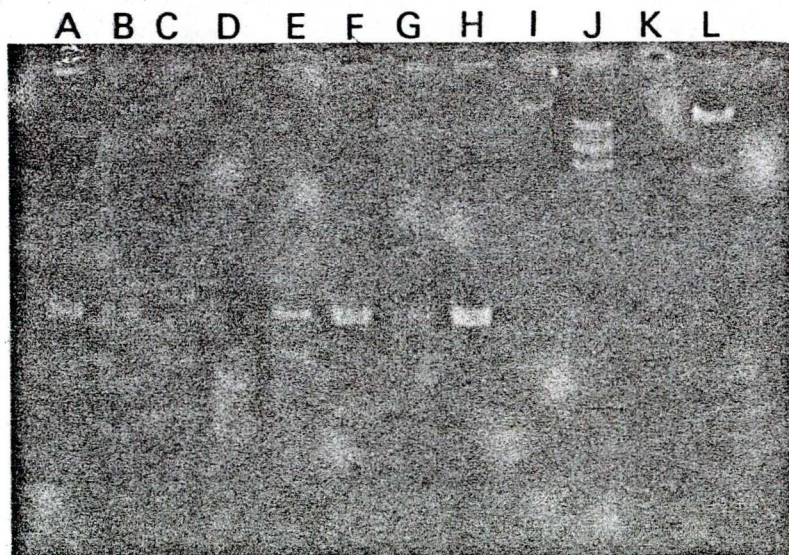
Kísérleteink során 15 különböző restrikciós enzimmel próbáltuk hasítani a plazmid DNS-t, ezek közül XhoI, BamHI, BglI, EcoRI, XbaI, Alu2, HpaII, SalI, SmaI, AluII nem emésztette a plazmid DNS-t.

Igen sok fragmentumot eredményezett a HindIII, HpaI, MboI és MboII emésztés.

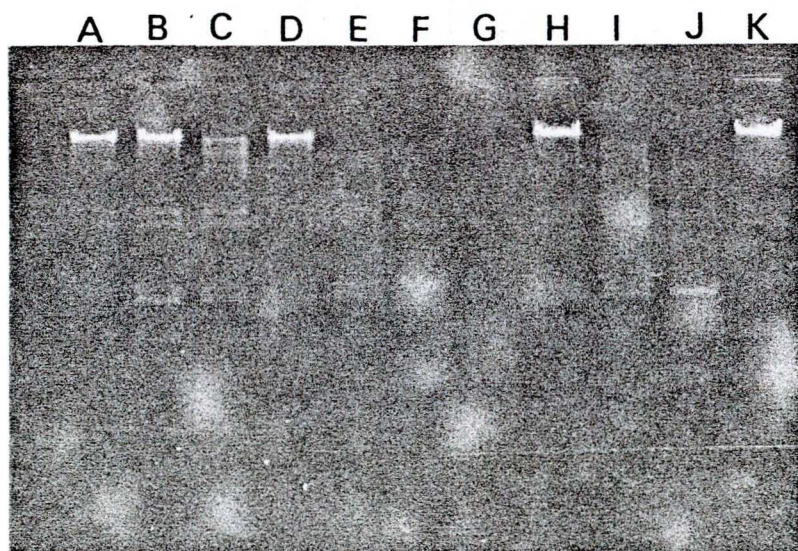
Viszonylag keveset a PstI és a BglII restrikciós enzimekkel történt hasítás.



1. ábra Pseudanabaena 6903 törzs plazmidjainak elektrofo-  
rézise 0,6%-os agaróz gélben.  
Teljes plazmid DNS /A/; emésztés BglII /B/;  
HindIII /C/ enzimekkel. A plazmidok kettős BglII,  
HindIII emésztése /D/.

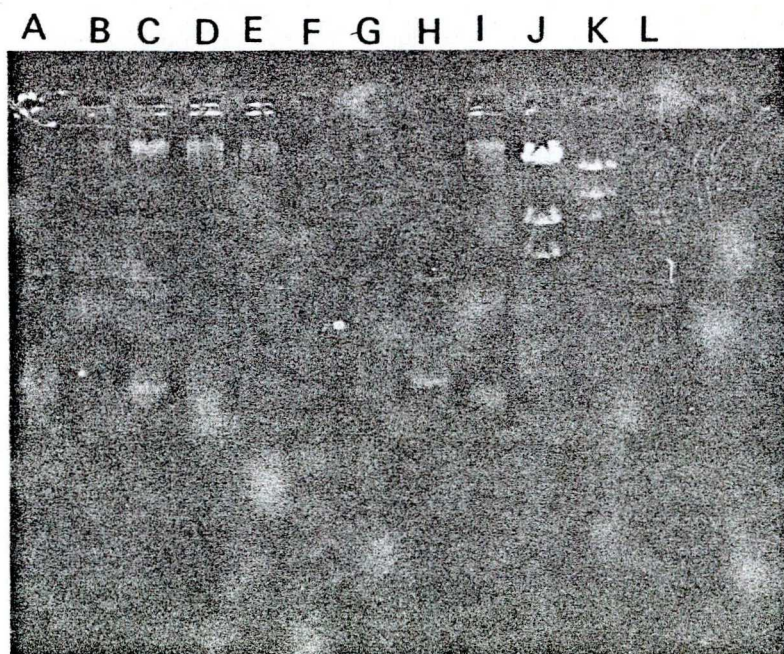


2. ábra pPA 6903 Pseudanabaena plazmidok restrikciós emésztése. XhoIII /A/; BamHI /B/; BglI /C/; PstI /D/; EcoRI /E/; HindIII /F/; MboI /G/; HpaI /H/; SmaI /I/; BglIII /J/. Emésztetlen plazmid DNS /K/. A DNS-t 0,6%-os agaróz gélben választottuk el.



3. ábra pPA 6903 Pseudanabaena plazmidok restrikciós emésztése 0,6%-os agaróz gélen történt elektroforézis után. Emésztetlen plazmid DNS /A; H/; PstI /B/; HindIII /C/; MboI /D/; HpaI /E/; SmaI /F/; BglII /G/ emésztések.  
λ DNS /I/; BglII /J/; Hpa /K/ és HindIII /L/ emésztett λ DNS.





4. ábra pPA 6903 Pseudanabaena plazmidok restrikciós emésztése. XboI /A/; AluI /B/; HpaII /C/; Sall /D/; XhoIII /E/; MboII /F/; PstI /G/; BglII /H/; emésztetlen plazmid DNS /I/; HindIII /J/; BglII /K/; Hpo /L/ emésztett  $\lambda$  DNS. A DNS elválasztása 0,6%-os agaróz gélben történt, elektroforézissel.

További munkáinkhoz a BglII emésztés eredményeként kapott viszonylag nagyméretű DNS darabok látszottak alkalmasnak, ezek egyikében feltehetően érintetlenül maradt az esszenciális régió, ami biztosítja a plazmid zavartalan replikációját.

Elgondolásunk az volt, hogy a BglII enzimmal emésztett plazmid DNS darabokat beépítjük a pHC 624 E.coli plazmid BglII helyére.

#### A pHC 624 plazmid

A pHC 624 plazmid a pBR322 plazmid származéka. Mérete 2.015 bp. Ampicillin rezisztenciát kódol.

Az ampicillin génben két restrikciós endonukleáznak, az eredeti pBR322 térkép szerint a 3.747 bp helyen, PvuI-nek és a 3.608 helyen PstI-nek van felismerő, illetve hasítóhelye.

Az ampicillin gén mellett az EcoRI helyen egy 80 bp hosszúságú polilinkert tartalmaz. EcoRI, SmaI, BamHI, XhoI, SalI, és HindIII a PstI, XhoI és BglII klónozóhelyekkel.

/10. ábra/

A plazmid replikációt reguláló RNS1 3' végéhez közel egy pontmutáció folytán, ami egy GT transzverzióknak bizonyult, az RNS1 transzkripciója nem terminált és az elongált transzkriptum nem funkcionál, mint replikációs represszor. A sejtenkénti kópiaszám kb. 1.000, 65%-a a totál sejt DNS-nek, míg a normál plazmidé 20-50/sejt.

A magas kópiaszám lehetővé teszi nagy mennyiségű DNS nyelését. A plazmidot amplifikálni nem kell /Boros I., személyes közlés, 1983/.

A polilinken lévő hasítóhelyekre történő DNS beépülés rezisztencia gént nem inaktivál, de a beépülés olyan nagy mértékű, hogy szelekció nélkül is 60-80%-ban kaptunk mesterséges rekombinánsokat.

A beépülés még tovább fokozható alkalikus foszfátáz kezeléssel, amely megakadályozza a vektor recirkularizációját.

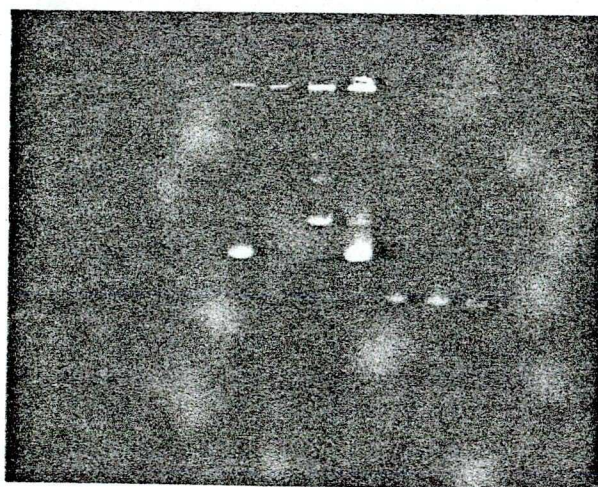
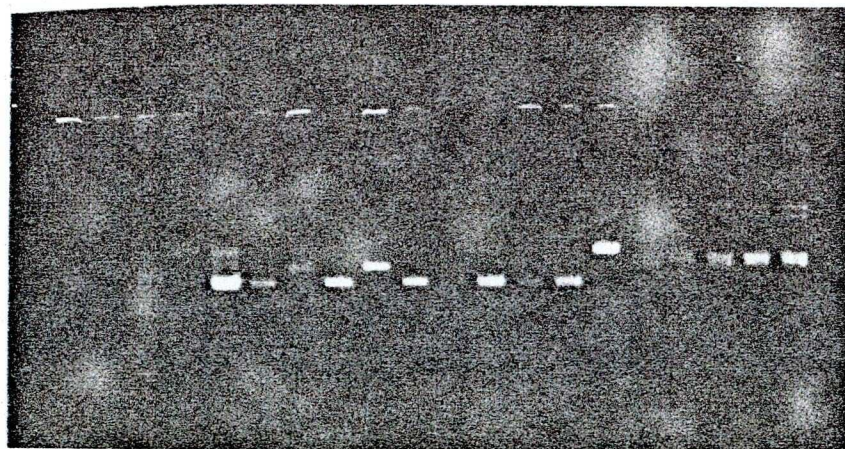
A Cianobaktériumokban történő klónozáshoz igen előnyös, hogy a plazmid nem tartalmazza a pBR322 plazmid Ava helyét, amely a Cianobaktérium fajokban termelődő Ava endonukleáz miatt a plazmid emésztéséhez és elvesztéséhez vezetne.

#### Hibrid plazmidok

A pseudanabaena 6903 törzs plazmidjainak BglII emésztéssel kapott fragmentjeit a pHC 624 plazmid BglII helyére építettük be. Ligáláskor 4-5-szörös Pseudanabaena plazmid DNS-t használtunk a vektor DNS mennyiségéhez képest.

A ligátummal HB 101 sejteket transzformáltunk és az ampicillin rezisztens klónokat elemeztük. Plazmid DNS-t tisztítottunk és azt az eredeti pHC 624 plazmid mellett agaróz gélen futtattuk. Várakozásunknak megfelelően megjelentek a BglII fragmentum beépülése miatt nagyobb molekulású plazmidok.

Az 5. és 6. ábrán látható 27 izolált kolónia plazmid DNS-ének agaróz gélelektroforetikus analízise. A plazmidok között 7 láthatóan nagyobb molekulású hibrid plazmidot mutattunk ki.



5. és 6. ábra  $Ap^r$  E.coli HB 101 izolált telepek plazmid DNS-e. A 3, 4, 9, 15, 21, 23 és 24 számú bizonyult hibrid plazmidnak.

Egy újabb kísérletben még egy hibrid plazmidot kaptunk.

A hibrid plazmidot tartalmazó kolóniákat YTB tápfolyadékban felszaporítottuk, plazmid DNS-t tisztítottunk belőlük, és a plazmid DNS-sel *Pseudanabaena* 6903 sejteket transzformáltunk.

A transzformált sejteket Allen lemezekre szélesztettük, majd 16 óra regenerálódás után az agar alá ampicillint pipetáztunk.

Az ampicillin koncentrációja 5, illetve 10  $\mu\text{g/ml}$  volt, az agar teljes térfogatában.

A szenzitív sejtek két nap múlva elpusztultak, a rezisztensek 4-5 nap után felnőttek.

A nyolc hibrid plazmiddal történt transzformáció rezisztens *Pseudanabaena* utódokat eredményezett.

Az izolált telepekből 20 ml folyadéktenyészeteket inokuláltunk, és meghatároztuk az ampicillin rezisztencia mértékét, 0, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 20 és 40  $\mu\text{g/ml}$  ampicillint tartalmazó tápfolyadékban.

A hibrid vektort hordozó *Pseudanabaena* sejtek 2-5  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin rezisztenciát mutattak. Magasabb, mint az eddig leírt 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  érték /Seijffers, 1983; Shermann és Putte, 1982/.

A telepek megjelenése után azonnal elvégeztük a folyadéktenyészet inokulálását, mert az így is hosszú inkubációs idő alatt a rezisztens sejtekből kidiffundáló  $\beta$ -laktamáz lebontja a környezetében lévő ampicillint, és olyan sejtek jelenhetnek meg, amelyek  $\text{Ap}^{\text{r}}$ -nek tűnnek /Maniatis, 1982/.

A rezisztens telepeket felszaporítottuk és plazmid DNS-t tisztítottunk belőlük.

A plazmidok egy részét agaróz gélen elemeztük, más részével HB 101-es sejteket transzformáltunk.

A Pseudanabaena sejtekből visszanyert ampicillin rezisztenciát kódoló plazmidok várhatóan nagy méretű hibridek lesznek, és jelen lehet még az eredeti plazmidok egyike vagy mindkettő is.

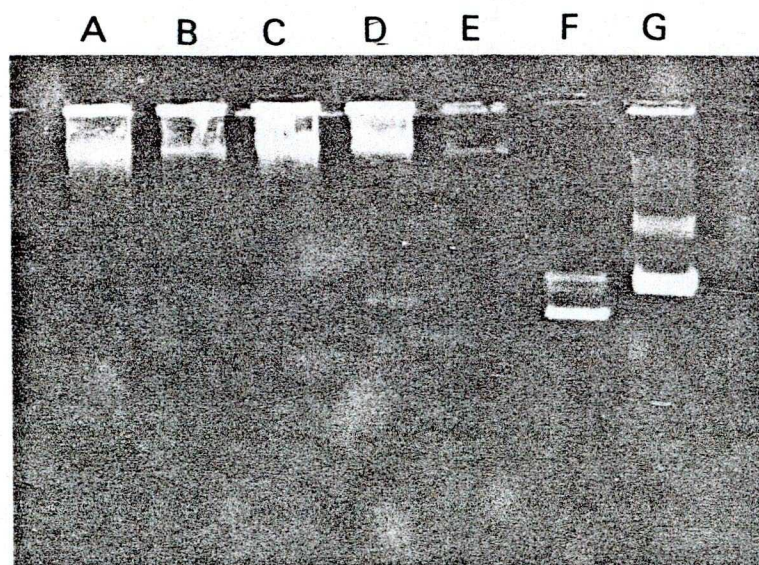
Várakozásunkkal ellentétben az elemzett 27 klón plazmidjai között nagy méretű hibridet nem találtunk. A visszanyert plazmidok mérete az eredeti Pseudanabaena plazmidhoz hasonlított, és ettől csak kis eltéréseket mutatott.

Mivel a plazmidok  $Ap^r$  kódoltak, méretük ellenére feltételezhető, hogy hibridek és delécióval elvesztették egy részüket. /7. ábra/

Ki kellett deríteni, mely részeket érintett a deléció. Mielőtt azonban hozzákezdünk volna a restriktációs elemzéshez, a következő elgondolást követtük.

Hibrid plazmidunknak tartalmaznia kell az ampicillin rezisztencia gént, mint szelektálható markert, a pHC 624 plazmid replikon régióját, az E.coli sejtekben történő replikációhoz, a Pseudanabaena plazmid replikonját Cianobaktériumban való replikációhoz és a polilinkert klónozó helyeivel.

Az eddigi kísérletek eredményeként bizonyos, hogy a plazmid kódolja az ampicillin gént, amely expresszálódik, képes Cianobaktériumban replikálódni, tehát meg van a Pseudanabaena plazmid replikonja is. A pHC replikon jelenlétének ellenőrzésére a visszavittük a plazmidokat HB 101 sejtekbe.



7. ábra Hibrid plazmidok *Pseudanabaena* 6903 transzformáció után. /A - E/ eredeti *Pseudanabaena* plazmidok /F/ és pHC 624 plazmid /G/.

Aholis a 28 plazmiddal történt transzformáció után mindössze 4 ampicillin rezisztens telepet kaptunk. A telepek közül kettőből nem tudtunk plazmid DNS-t tisztítani, kettő tartalmazott plazmidot. A plazmidok mindegyike igen magas kópiaszámban volt jelen.

Sejtenkénti kópiaszámuk azonban eltérő volt, amint az az azonos kezdeti baktériummennyiségből nyert plazmid DNS eltérő mennyisége mutatja. /8. ábra, T,U/

A plazmidok teljes és részleges emésztése látható a 8. és 9. ábrán.

A két deléciós hibrid plazmidon BglIII, HindIII, EcoRI, PstI, BamHI restrikciós enzimekkel végzett elemzések eredményeként megállapítható volt, hogy a két plazmid azonos hasítóhelyekkel rendelkezik.

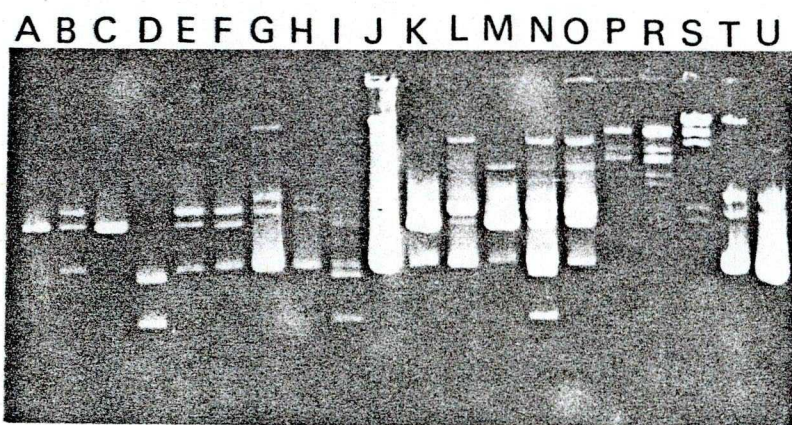
Restrikciós emésztések alapján megadható a plazmid térképe /10. ábra/.

A pHD plazmid mellett feltüntettük a pHC 624 plazmidot, p pBR322 plazmidot és a pHC 624 + pAB 6903 hibrid plazmidot.

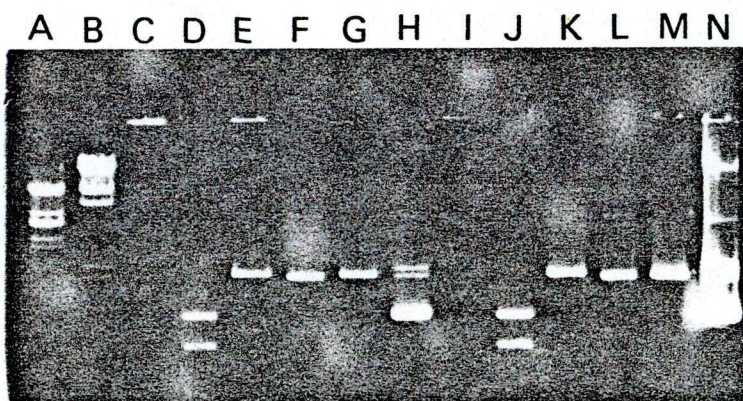
A pHD plazmid tehát ampicillin rezisztenciát kódol, több restrikciós enzim egyetlen hasítóhelyét tartalmazó polilinkerrel rendelkezik, valamint megtalálható rajta a pHC 624 és a pPA 6903 plazmid replikációs origója, amely lehetővé teszi a plazmid replikációját *Escherichia coli* és *Pseudanabaena* gazdában is.



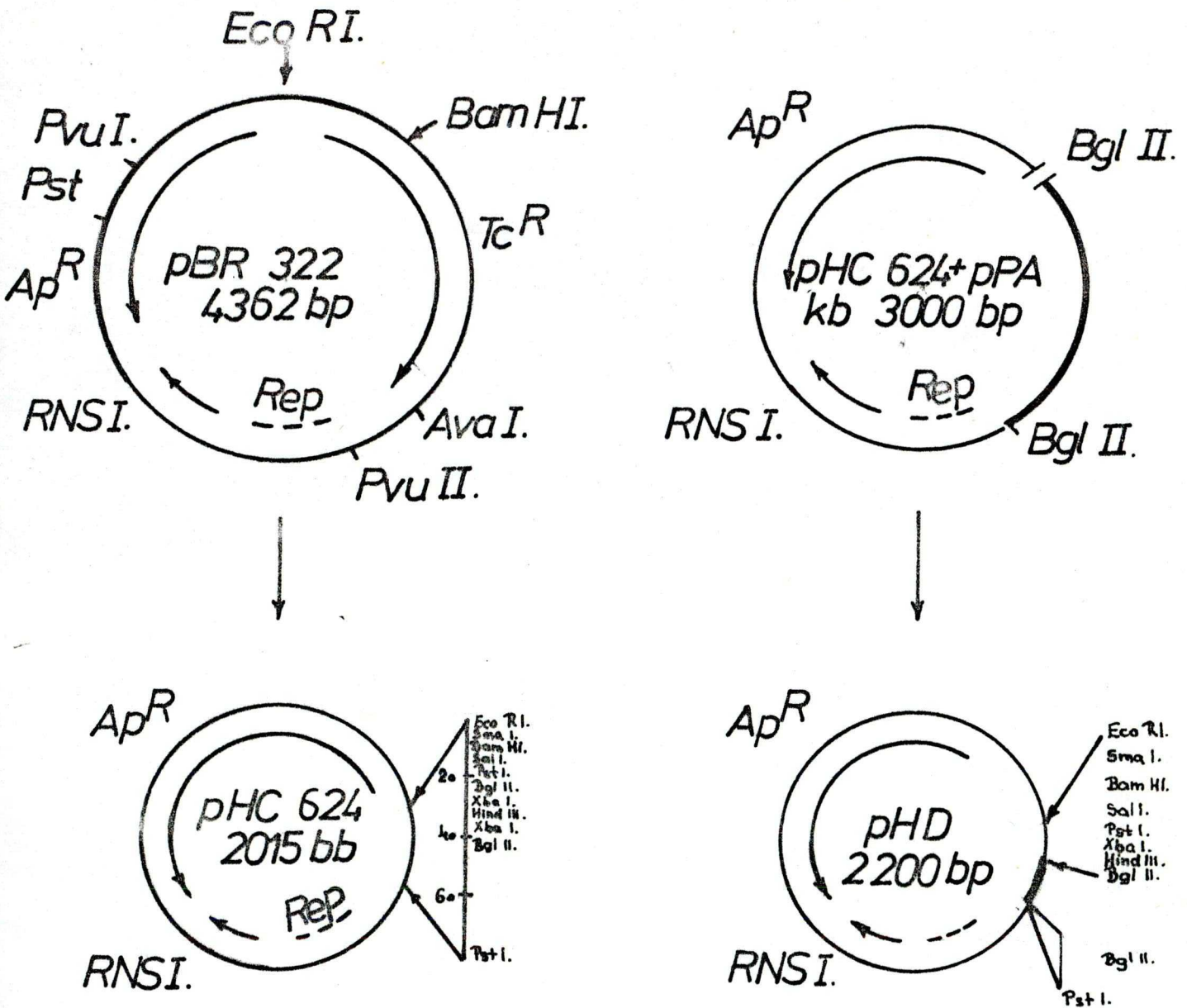




8. ábra Hibrid plazmidok részleges restrikciós emésztése. /A-E/ pHC 624 plazmid, /F-J/ pHD-1, /K-O/ pHD-2. BglIII /A,F,K/, HindIII /B,G,L/, EcoRI /C,H,M/, PstI /D,I,N/, BamHI /E,J,O/.  $\lambda$  DNS Hpa /P,S/, HindIII /R/ emésztése. Emésztetlen pHD-1 /T/ és pHD-2 /U/.plazmid DNS. Az elektroforézis 0,6%-os agaróz gélben történt.



9. ábra a pHD-1 ps pHD-2 hibrid plazmidok restrikciós emésztése. Hpa és HindIII emésztett  $\lambda$  DNS /A,B/, pH-2 plazmid /C-H/, pH-1 plazmid /J-N/, BamHI /C,I/, Pst /D,J/ EcoRI /E,K/, HindIII /F,L/, BglII /G,M/ Emésztetlen plazmid DNS pH-2 /H/, pH-1 /N/. A gélelektroforézist 0,6%-os agaróz gélben végeztük.



10. ábra A pBR322, pHC624, pHC624 + pPA és pHD plazmidok restrikciós térképe.

### Plazmidmentes sejtek előállítása

Munkám egyik célkitűzése volt olyan *A.nidulans* és *Pseudanabaena* sejtek előállítása, amelyek plazmidot nem tartalmaznak. Ezek alapvetően nem különböznek a plazmidos sejtektől /Doolittle, 1978/. Nagy mértékben megkönnyítik a transzformálás utáni plazmid visszanyerést, restrikciós elemzést, és szükségtelessé teszik a plazmidok méret-szerinti elválasztását, valamint kiküszöbölik az inkompatibilitás okozta plazmidvesztéseket, és a plazmidok közötti rekombinációt.

Az első kísérletekben plazmidtörlésre SDS-t használtunk, *A.nidulans* M4<sup>-</sup> sejtek kezelésére. Ezek streptomycin rezisztenciáját az S9 törzsből származó  $36 \times 10^6$  dalton plazmid kódolta.

A sejtekkel  $0-7 \times 10^{-3}\%$  SDS-t tartalmazó BG 11 tápfolyadékot indukáltunk  $10^3$  sejt/ml kezdeti koncentrációval. A legmagasabb SDS koncentrációt -  $4-5 \times 10^{-3}\%$  - túlélő sejteket  $2-3 \times 10^8$  sejt/ml koncentrációig növesztettük, majd lemezenként 400-500 kolóniával mesterlemezt készítettünk, amely streptomocint nem tartalmazott. Ezeket egy streptomycin nélküli és egy  $10 \mu\text{g/ml}$  streptomocint tartalmazó lemezre replikáztuk.

Kiválasztottuk azokat a kolóniákat, amelyek Sm jelenlétében nem nőttek, rezisztenciájukat és feltehetően a rezisztenciát kódoló plazmidjukat elvesztették.

A plazmidvesztés újabb próbájaként a telepeket újabb Sm tartalmú és antibiotikum nélküli lemezekre oltottuk. Ezzel az eljárással mindössze 5-7%-ban kaptunk plazmidmentes sejteket.

Ezek hosszadalmas felszaporítása és elemzése helyett célra-  
 vezetőbbnek látszott az E.coli-n eredményes, 80%-os plazmid-  
 törlő hatást kifejtő fenotiazin vegyületeket használni plaz-  
 midtörlésre.

Escherichia coli K12 sejteken végzett kísérletekben a tri-  
 ciklikus vegyületek közül igen magas százalékban eredménye-  
 zett plazmidmentes telepeket a desipramin, a melipramin és  
 származékai /2. ábra/, valamint a klórpomazin oxo- és hidrox-  
 -származékai /3. ábra/.

Első lépésként meg kellett határozni azt a koncentráció-  
 tartományt, amelyben a Pseudanabaena sejtek még túlélik a  
 kezelést.

Pseudanabaena folyadékkultúra 5 ml-éhez 5-100 µg/ml koncent-  
 rációban adtunk prometazint és melipramint. A kezelés ered-  
 ménye az 5. táblázatban látható.

24 órás inkubáció után a Pseudanabaena sejtek 5 µg/ml  
 melipramin és 10 µg/ml prometazin kezelést éltek túl. A túl-  
 élő sejteket lemezekre szélesztettük. Az izolált telepekből  
 5-5 ml folyadékkulturát inokuláltunk és ebből plazmidot tiszt-  
 titottunk.

Mivel az E.coli F'lac plazmiddal végzett előzetes kísér-  
 letekben igen magas százalékban kaptunk plazmidmentes kolóni-  
 ákat, a kísérleteket az eredeti nem-rezisztens plazmidot tar-  
 talmazó Pseudanabaena 6903 sejtekkel végeztük. Bizva abban,  
 hogy előzetes, antibiotikum rezisztencia vesztés ellenőrzése  
 nélkül direkt plazmidtisztítással is a várt eredményt kapjuk.

6 kolónia elemzése során 3 bizonyult plazmidmentesnek,  
 3 pedig csak az egyik plazmidot tartalmazta, az eredetinel ki-  
 sebb kópiaszámban /11. ábra/.

5. táblázat Pseudanabaena sejtek túlélése melipramin és prometazin tartalmu tápfolyadékban

	$\mu\text{g/ml}$	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	10 nap
Melipramin	5	+	+	+
	10	+	-	-
	20	+	-	-
	40	-	-	-
Prometazin	5	+	+	+
	10	+	+	+
	20	+	-	-
	40	+	-	-

A fenotiazinok plazmid replikációra kifejtett hatását pBR322 plazmidokat hordozó E.coli K12 sejteken elemeztük.

Az imipramin és prometazin bakteriális növekedést gátló /Farkas és Molnár, 1980/, és gátolja az intracelluláris plazmid transzfert is /Molnár, 1980a, Mándi és Molnár, 1981/. A vegyületek képlete a 12. ábrán látható.

Az ebbe a csoportba tartozó számos más vegyület, mint pl.: a 11. és 12. ábrán látható vegyületek, - gátolja az R faktor in vitro replikációját /Molnár, 1980b/.

A hatás nem magyarázható a plazmid DNS-be történt interkalációval, inkább membránra kifejtett hatásukkal /Barabás és Molnár, 1981/.

E vegyületek sejtmembránon lévő receptorainak ismert

egyéb szubsztrátjai nem csökkentették az imipramin és klórpromazin plazmidtörlő hatását /Molnár, 1982/. Mivel ezek az indirekt vizsgálatok nem mutattak ki specifikus receptorhelyeket, a  $H^3$ -imipramin kötőhelyeket közvetlenül vizsgáltuk, feltételezve, hogy ezek a helyek kapcsolatosak a plazmid replikációval.

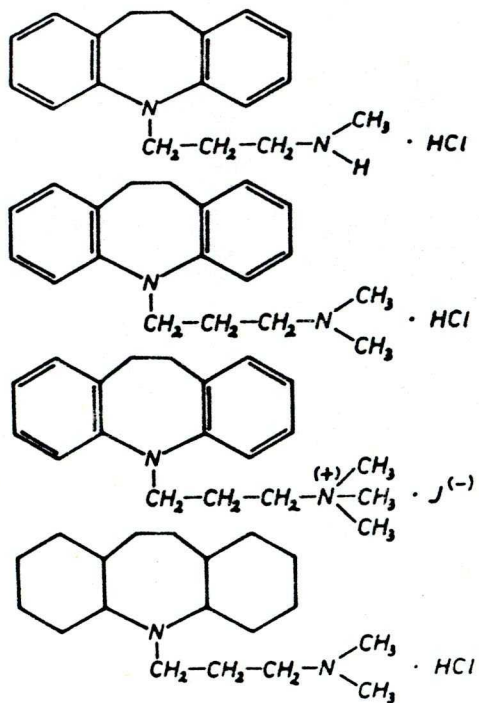
A  $H^3$ -imipramin kötődése az E.coli K12 F'lac plazmidot hordozó sejtjeiben koncentráció-függő volt és lineárisan növekedett a  $0,1 \times 10^0 - 1,0 \times 10^5 \mu M$  tartományban  $0^\circ C$ -on vizsgálva. /2. ábra/

A kötődés telithető volt  $1,0 \times 10^5 - 5,0 \times 10^5 \mu M$  koncentrációval. Mivel más, hasonló szerkezetű vegyületek, mint akridin orange, dezipramin, metilénkék és prometazin hatással vannak a plazmid replikációra, vizsgáltuk ezek kompetícióját az imipramin kötésre. Akridin orange, dezipramin és prometazin csökkentette  $H^3$ -imipramin kötődést, a metilénkék jelentősen megnövelte /3. ábra/.

A plazmid replikációra kifejtett hatás további vizsgálatát jelölt pBR322 plazmid fordított orientációju membrán vezikulumok kötődésével végeztük imipramin, klórpromazin, 7,8-dioxo-klórpromazin és metilénkék jelenlétében.

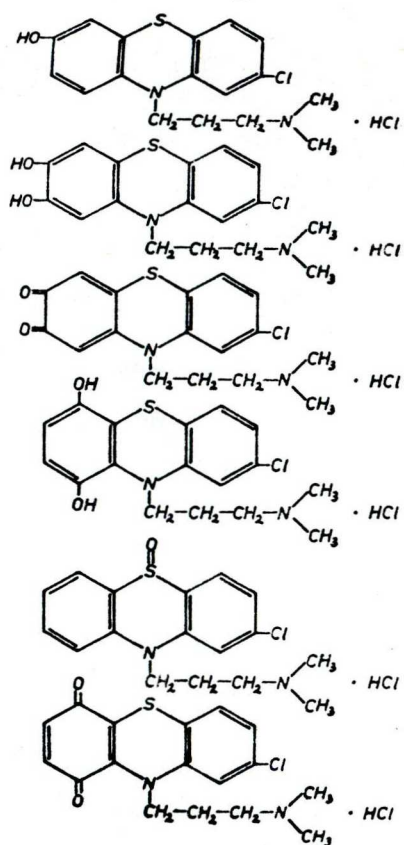
A plazmid DNS hatékonyabban kötődött imipramin és klórpromazin jelenlétében, mint ezek inaktív származékai jelenlétében, vagy a kontroll kísérletekben /6. táblázat/.

Az eredményekből következően a nem specifikusan kötődő imipramin felelős a plazmidtörlésért, mivel imipramin, dezipramin és más rokon vegyületek viszonylag magas koncentrációban gátolják a plazmid replikációt.

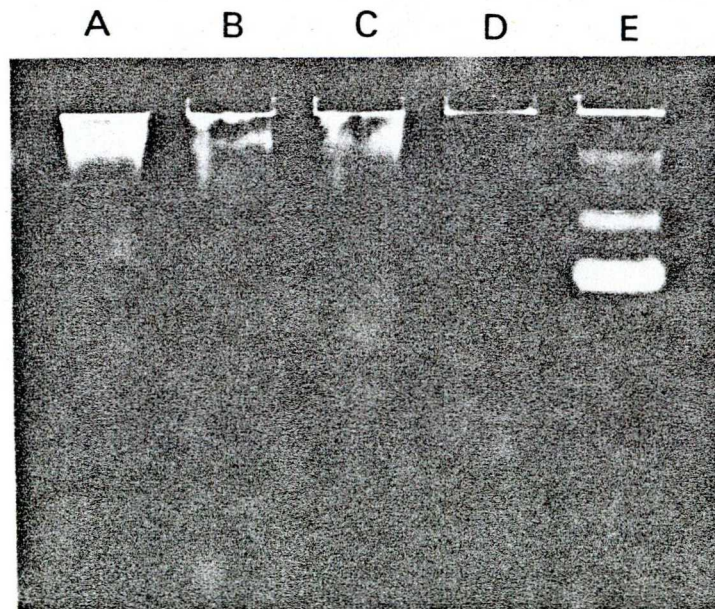


11. ábra Plazmidtörlő hatású vegyületek  
 desipramin /A/, melipramin /B/, melipramin-  
 -metilén-jodid /C/ és telített melipramin

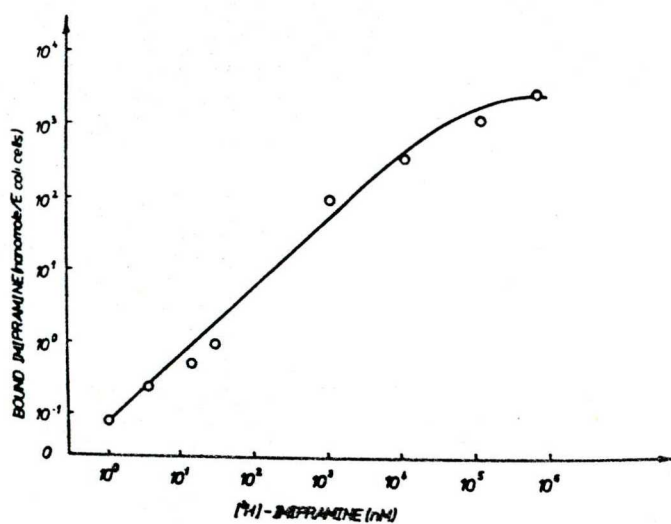




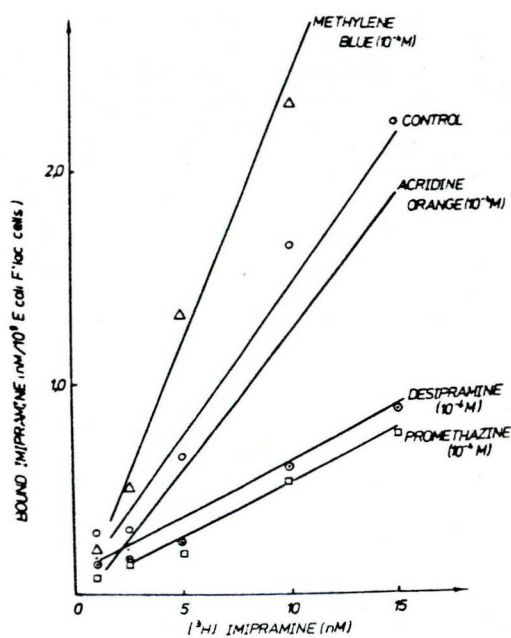
12. ábra Plazmidtörlő hatásu klórpromazin hidroxí, dihidroxí, oxo- és dioxo-származékai



13. ábra Melipraminnal kezelt *Pseudanabaena* telepek plazmid-  
mai /A-D/; A /D/ kolónia plazmid DNS-t nem tartal-  
maz. /A,B,C/ igen keveset. Kezeletlen *Pseudanabaena*  
kolónia plazmid DNS-e /E/. A DNS mintákat 0,6%-  
os agaróz gélben elektroforetikusan analizáltuk.



14. ábra  $^3\text{H}$ -imipramin koncentráció-függő kötődése *E. coli* K12 F'lac sejtekben



15. ábra  $H^3$ -imipramin kötődése E.coli K12 F' lac sejtekhez különböző triciklikus vegyületek jelenlétében

6. táblázat  $P^{32}$ -jelölt pBR322 DNS kötődése fordított orientációjú E.coli HB101 membrán vezikulákhoz, különböző triciklikus vegyületek jelenlétében

M i n t á k		Kötött plazmid DNS µg/100 µg membrán protein
1. membrán + puffer	+ DNA	0,51
2. membrán + klórpromazin	+ DNA	0,89
3. membrán + 7,8-dioxo-klórpromazin	+ DNA	0,64
4. membrán + imipramin	+ DNA	0,73
5. membrán + telített imipramin	+ DNA	0,44
6. membrán + metilén-kék	+ DNA	0,53
7. puffer + klórpromazin	+ DNA	0,038
8. puffer + imipramin	+ DNA	0,016

A minták proteintartalma 100 µg, a plazmid DNS-tartalom 1,0 µg volt. A triciklikus vegyületeket  $3 \times 10^{-5}$  M koncentrációban alkalmaztuk.

Különböző triciklikus vegyületek gátolták az imipramin membránhoz történő kötődését. Feltehetően közös a kötőhelyük, mindegyik bír plazmid replikációt gátló hatással is /Farkas, Molnár, 1979; Molnár, 1980b/. Mig metilénkék bár fokozta az  $H^3$ -imipramin kötődését intakt sejteken, nem kötődött a fordított orientációjú bakteriális membrán vezikulákhoz.

Ugy tűnik, a metilénkék elősegíti az imipramin sejtekbe való bejutását és ezek következtében nő a plazmidtörölő hatás

/Molnár, 1978/.

A fenotiazinok jelenlétében a plazmid DNS-nek a membrán belső feléhez történő kötődése megnövekszik, feltehetően a DNS-membrán komplex képződése vezet a replikáció gátlásához, a stabil komplex nem teszi hozzáférhetővé az origót a replikációs enzimek számára /Molnár, 1983/.

Eredményeink összhangban állnak az in vitro körülmények között megfigyelt DNS-membrán komplex DNS szintetizáló képességének a szabad DNS-éhez képest történő növekedésével /Benjamin, 1982/.

További kísérletek szükségesek annak igazolására, hogy hogyan rendeződnek el a plazmid replikáció komponensei, valamint a vegyületek bakteriális membránon történő transzlokációjának tisztázására.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat eredményei a következőkben foglalhatók össze.

Több Cyanobaktérium faj plazmidjait vizsgálva, két kisméretű fenotipikus sajátsgot nem kódoló plazmidot, pPA 6903-1-t és pPA 6903-2-t azonosítottunk.

A plazmidok BglIII fragmentjeit a pHC 624 plazmid BglIII helyére építve egy olyan deléciós hibrid plazmidot kaptunk, amely szelektálható tulajdonságot, Ap<sup>R</sup>-t kódol. Polilinkerén 8 restrikciós enzim felismerő, illetve klónozó helyét tartalmazza. Magas kópiaszámban replikálódik, ami lehetővé teszi a klónozott DNS nagy mennyiségben történő nyerését. A plazmidon ezenkívül megtalálható a pHC 624 és a pPA 6903 plazmid replikációs origója is, amely lehetővé teszi, hogy a plazmid *Escherichia coli*-ban és *Pseudanabaena* gazdában is replikálódjon. Ezáltal a két rendszer összekapcsolható és előnyösen használható a klónozási feladatnak megfelelően.

Recipiens sejtek létrehozásával sikerült megoldani a cianobakteriális klónozásban eddig problémát jelentő nagy méretű ismeretlen kompatibilitású és restrikciós térképű plazmidok eltávolítását. A plazmidtörlést *Pseudanabaena* sejteken meliprominnal végeztük. A plazmidtörlés hatásmechanizmusának felderítésére *Escherichia coli* sejteken vé-

geztünk kísérleteket, több aktiv fenotiazin típusu vegyülettel. Megállapítottuk, hogy a plazmid elvesztését az okozza, hogy a plazmid DNS e vegyületek jelenlétében igen szoros komplexet képez a bakteriális membránnal, amely megakadályozza a plazmid DNS replikációját.

Az irodalomban ismertetett cianobakteriális transzformációt módosítva rövid ideig tartó 0,1 M  $MgCl_2$  és 0,1 M  $CaCl_2$  mosást, illetve inkubálást iktatva be az eljárásba, sikerrel oldottunk meg *Pseudanabaena* sejtek transzformációját.





## IRODALOMJEGYZÉK

ALLEN MM /1968/

J. Phycol. 4, 1-4.

AHLUWALIA AS and MEYNELL GC /1977/

FEMS Microbiol. Lett. I. 363-365.

ASATO Y, GINOSA HS /1973/

Nature New Biol. 244, 132-133.

ASTIER C, ESPADELLIER F /1976/

C. R. Acad. Sci. Paris 282, 795-797.

BARABÁS K, MOLNÁR J /1980/

Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 37, 55-61.

BARTH PT, GÜNTER NS, BRADLEY DF /1978/

J. Bacteriol. 43-52.

BAZIN MJ /1968/

Nature 218, 282.

BENJAMIN P, STRUMPT P, KENNIG M, FISHEIN W /1982/

Nature, 298, 769-771.

BIRNBOIM HC, DOLY S /1979/

Nucl. Acids. Res. 7, 1513.

BOROS I, PÓSFÁI GY, VENETIANER P /1984/

Gene, in press.

BRILEY M, LANGER SZ /1981/

Eur. J. Pharmacol. 72, 377-380.

BRILEY MS, RAISMAN R, LANGER SZ /1979/

Eur. J. Pharmacol. 58, 347-348.

BOUCHARD DH /1964/

J. Gen. Microbiol. 54, 417-425.

BOYER HW, ROULLAND-DUSSOIX D /1969/

J. Mol. Biol. 41, 459.

BUKHARI AI, SHAPIRO JA, ADHYA SL /1977/

DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes.

Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.

DATTA N, HEDGES RW, SHAW EJ, SYKES R, RICHMOND MH /1971/

J. Bacteriol. 1244-1249.

DAVIS RW, BOTSTEIN D, ROTH IR /1980/

in Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory,  
Cold Spring Harbor, New York, pp. 116-117.

DELANEY SF, HERDMAN M, CARR NG /1976/

The Genetics of Algae; Blackwell, Oxford, pp. 7-28.

DERILLY CY, HOUGHTON JA /1977/

J. Gen. Microbiol. 98, 277-280.

DOOLITTLE WI /1979/

Adv. Microbiol. Physiol. 20, 1-102.

ELDEFRAWI ME, WARNICH JE /1981/

Biochemical Pharmacol. 30, 1391-1394.

FARKAS S, MOLNAR J /1979/

Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 26, 351-361.

FRIEDBERG D, SHEIFERS J /1979/

FEBS Lett. 107, 165-168.

FRIEDBERG D, SHEIFERS J /1983/

Gene 22, 267-275.

FISHER R, TULI R, HASELKORN R /1981/

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 3393-3397.

GEIER GE, MODRICH P /1979/

J. Biol. Chem. 254, 1408.

GRIGORIEVA G, SHESTAKOV S /1982/

FEMS Microbiol. Lett. 13, 367-370.

HERDMAN M /1973/

Mol. Gen. Genet. 120, 369-378.

HERDMAN M /1976/

J. Gen. Microbiol. 111.

HERDMAN M, JANVIER R, RIPPKA R, STANIER RY /1979/

J. Gen. Microbiol. 111.

HIROTA Y /1956/

Nature 178, 92.

HIROTA Y /1960/

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46, 57-64.

VAN DEN HONDEL CA, KEEGSTRA W, BORRIAS WE, VAN ARKEL GA /1979/

Plasmid 2, 323-333.

VAN DEN HONDEL CA, VERBEEK S, VAN DEN ENDE A, WEISBEEK PS,  
BORRIAS WE, VAN ARKEL GA /1980/  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 1570-1574.

KUHLEMEIER CJ, BORRIAS WE, VAN DEN HONDEL CA, VAN ARKEL GA  
/1981/  
Mol. Gen. Genet. 184, 249-254.

LADHA JK, KUMAR HD /1978/  
Biol. Rev. 53, 355-386.

LAU RH, DOOLITTLE WF /1979/  
J. Bacteriol. 137, 648-652.

LAU RH, SAPIENSA C, DOOLITTLE WF /1980/  
Mol. Gen. Genet. 178, 203-211.

LANGER SZ, ZAFFERIAN E, BRILEY M, RAISMAN R, SECHTER D /1981/  
Life Sciences 29, 211-220.

LOWRY OH, ROSENBERG NG, FARR AL, RANDALL RJ /1951/  
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MANDEL M, HIGA A /1970/  
J. Mol. Biol. 58, 154.

MÁNDI Y, MOLNÁR J /1981/  
Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 28, 205-210.

MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROOK J /1982/  
Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor NY.

MAZUR BJ, RICE D, HASELKORN R /1980/  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 186-190.

MOLNAR J, KIRALY J, MANDI Y /1975/  
Experientia 31, 444-445.

MOLNAR J, BÉLÁDI I, HOLLAND IB /1978/  
Genetical Res. Cambridge 31, 199-201.

MOLNAR J, SNEIDER B, MANDI Y, FARKAS S, HOLLAND IB /1980/a/.  
Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung. 27, 309-315.

MOLNAR J, DOMOKOS K, MANDI Y, FÖLDEAK S, HOLLAND IB /1980/b/  
Eds. Usdin, Eckert, Forest Ebsenier, North Holland Inc. p. 115.

MOLNAR J, CSISZAR K, TÓTH G /1983/  
Res. Comm. in Chem. Pathol. and Pharmacol. 39, 127-137.

DE PAMPHILIS ML, ADLER J /1971/.  
J. Bacteriol. 105, 395-407.

PAUL SM, REHAVI M, RICE KC, ITTAH V, SKOLNICK P /1981/  
Life Sciences 28, 2753-2760.

RADLOFF R, BAUER W, VINOGRAD I /1967/  
Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1514-1521.

REASTON J, VAN DEN HONDEL AM, VAN ARKEL GA, STEWARD WD /1982/.  
Plasmid 7, 101-104.

RIPPKA R, DERUNELLES J, WATERBURY JB, HERDMAN H, STANIER RY /  
/1979/  
J. Gen. Microbiol. 111,1-41.

ROBERTS TM, KOTHS KE /1976/.  
Cell 9, 551-557.

ROBERTS JR /1981/  
Nucl. Acid. Res. 9, 75-96.

- ROSEN BP, TSUCHYA T /1979/  
Methods in Enzymology 56, 233-242.
- SHERMANN LA, CUNNINGHAM /1977/  
Plant. Sci. Lett. 8, 319-326.
- SHERMANN LA, VAN DEN PUTTE P /1982/  
J. Bacteriol. 150, 410-413.
- SHESTAKOV SV, KHYEN NG /1970/  
Mol. Gen. Genet. 107, 372-375.
- SIMON RD /1978/  
J. Bacteriol. 136, 414-418.
- SOUSTEIN SA, BALDWIN JN /1972/  
J. Bacteriol. 109, 262-265.
- STANIER RY, COHEN-BAZIRE G /1977/  
Ann. Rev. Microbiol. 31, 225-274.
- STEVENS SE, PORTER RD /1980/  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 6062-6056.
- STRÜBER D, BUJARD H /1981/  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 167-171.
- SUTCLIFFE YG /1978/  
Nucl. Acids. Res. 5, 2721.
- TANDEAU DE MARSAC N, BORRIAS WE, KUHLEMEIER CS, CASTETS AM,  
ARKEL GA, VAN DEN HONDEL CA /1982/  
Gene, 111-112.

TOMODEA M, INUZUKA M, ANTO S, KONISHI M /1974/  
J. Bacteriol. 1158-1163.

WARING M /1970/  
J. Mol. Biol. 54, 247-279.

WALLACE DC, MOROWITZ HF /1973/.  
Chromosoma 40, 121-126.

