

RHIZOBIUM MELILOTI 41 TRANSZFORMÁCIÓJA ÉS
TRANSZFEKCIÓJA PLAZMID ÉS FÁG DNS-EKKEL

Írta: Kálmán Zsuzsanna



DOKTORI ÉRTEKEZÉS

1984.

ELŐZETES KÖZLEMÉNYEK A SZEGEDI EGYETEM KÖZLEMÉNYEI
KÖZLEMÉNYEK A SZEGEDI EGYETEM KÖZLEMÉNYEI

B 51



Írta: Kálmán Zsuzsanna



DR. KÁLMÁN ZSUSZANNA

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS /Irodalmi áttekintés/	1
1/. Transzdukció	2
2/. Konjugáció	3
3/. Transzfekció és transzformáció	5
A/. A Gram pozitív baktériumok transzformációja	6
B/. A Gram negatív baktériumok transzformációja	10
C/. Transzfekció	13
D/. Mesterséges transzformációs módszerek	15
E/. Transzfekció és transzformáció Rhizobium fajoknál	17
CÉLKITŰZÉSEK	19
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
1/ Baktérium törzsek, fágok és plazmidok	20
2/ Táptalajok	20
3/ Antibiotikumok	20
4/ Baktérium törzsek tárolása, növesztése és keresztezése	21
5/ Agaróz gélelektroforézis	21
6/ Restriktív endonukleáz emésztés, T ⁴ ligáz reakció és alkalikus foszfatáz kezelés	21
7/ Plazmid izolálási módszerek	23
8/ A Rhizobium meliloti 41 11-es fág DNS-ének tisztítása	25

9/ A Rhizobium meliloti 41 transzfekciójának és transzformációjának általunk kidolgozott általános sémája	25
10/ Escherichia coli transzformáció	26
11/ Növényi teszt	27
12/ DNS jelölése nick-transztlációval	28
13/ Kolonia hibridizáció	28
EREDMÉNYEK	31
1/. Transzfekciós rendszer kidolgozása Rhizobium meliloti 41-re	31
1.1 A Rhizobium meliloti 41 sejtek kompetencia állapotának változása a növekedés különböző fázisaiban	32
1.2 A Mg^{2+} és Ca^{2+} ionok hatása a transzfekció gyakoriságára	32
1.3 A DNS koncentráció változása és a transzfekciós gyakoriság közötti összefüggés vizsgálata	33
1.4 A hő sokk hatása a transzfekció gyakoriságára	34
1.5 A transzformációt követő fág szaporodás kinetikájának vizsgálata	35
2/. Rhizobium meliloti 41 transzformációja plazmid DNS-el	36
2.1 Transzformálás a pGV1106 vektor Rhizobium meliloti 41 11-es fág DNS fragmentjeit hordozó rekombináns plazmid származékaival	38
2.2 Transzformálás a Rhizobium meliloti 41-be juttatott és abból visszaizolált pGV1106 plazmiddal	39
2.3 A pGV1106 mobilizálása Rhizobium meliloti 41-be	40

2.4 A Rhizobium meliloti 41 transzformációja pKK1 és pKK2 plazmid DNS-ekkel	41
2.5 A pKK2 plazmid ujboli bevitele konjugációval Rhizobium meliloti 41-be	44
2.6 A pKK2 plazmid kópiaszáma Rhizobium meliloti41-ben	44
2.7 A pKK2 plazmid fizikai térképe	46
2.8 Előkísérletek a transzformációs gyakoriság növelésére	47
2.9 A Rhizobium meliloti 41 nitrogénáz struktúrgénjeit hordozó pRm41b plazmid 13 kb méretű BamH I fragmentjének klónozása a pKK2 plazmidra	48
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	50-61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	62
IRODALOM	

BEVEZETÉS

A mezőgazdasági termőterületek hozamának emelésére, a kimerült talajok javítására napjainkban intenzív módon foszfor- és nitrogéntartalmú műtrágyákat használnak. A műtrágyák előállítása költséges és energiaigényes folyamat, ugyanakkor fokozott felhasználásuk felboríthatja a természetes ökológiai rendszerek kialakult egyensúlyát.

A természetben a légköri nitrogén megkötésére, ammóniává való átalakítására számos mikroorganizmus képes. A folyamat során a mikroorganizmusok nitrogénáz enzimkomplexe a légköri nitrogént egy többlépéses redukív reakción keresztül alakítja ammóniává. A mikroorganizmusok egy része szabad állapotban, más típusaik növényekkel kölcsönhatásban, un. szimbiózisban képesek a légköri nitrogén megkötésére. Az utóbbi csoport ismert képviselője a Gram-negatív pálcák és kokkusok közé, a Rhizobiaceae családba tartozó obligát aerob heterotróf *Rhizobium meliloti* 41 baktérium, mely a lucernával *Medicago sativa* L./ obligát szimbiózisban élve képes a légköri nitrogén megkötésére.

A *Rhizobium meliloti* 41 a lucerna gyökérszőrőket fertőzve, a növény gyökerein jellegzetes un. gümőképzést indukál. A gümő kialakulását eredményező és a gümőkben a jellegzetes baktérium-bakteroid átalakuláson át a szimbiotikus nitrogénkötéshez vezető komplex folyamat egyes lépéseiért mind bakteriális, mind növényi gének felelősek. Az SZBK Genetikai Intézetének Mikrobiális Genetikai Csoportja az intézet megalakulása óta a *Rhizobium meliloti* 41 baktérium genetikai

analízisével foglalkozik a szimbiózis és nitrogénfixálás folyamatában szerepet játszó bakteriális gének vizsgálata, működésük és szabályozásuk megismerése és a gyakorlat szempontjából fontos, esetleges módosítása céljából.

A Rhizobium meliloti 41 baktérium szinten és szimbiózisban megnyilvánuló génjeinek vizsgálatához baktérium mutánsok izolálása mellett szükséges volt a Rhizobium meliloti 41-re alkalmazható bakteriális genetikai módszerek kidolgozása.

Az egyes bakteriális, szimbiótikus funkciók és gének egymáshoz rendelése adott funkciókban mutáns gének genetikai térképezésével, majd további genetikai és fizikai analízisével végezhető el a klasszikus bakteriális genetika és molekuláris genetika módszereivel.

A klasszikus genetikában megismert térképezési, vagy általánosítva, információátviteli módszereket a Rhizobium meliloti 41 esetében sajátosan módosították. A következőkben ezeket a módszereket tekintjük röviden át.

1/. Transzdukció

A transzdukció során a donor baktérium génjei a recipiens baktériumokba bakteriofágokkal kerülnek át. Annak megfelelően, hogy a géntranszfer bármely vagy csak meghatározott bakteriális /kromoszómális/ géneket érint beszélünk általános illetve speciális transzdukcióról. A transzdukció és a transzdukcióra használt bakteriofág típusától és genomjának méretétől függően a transzdukció csak korlátozott méretű kromoszómaszakaszok térképezését teszi lehetővé és elsősorban már elkészített kromoszómatérképek pontosításához, az

un. finomtérképezéshez nyújt segítséget. Az R.m.41 esetében két természetes fág izolátumot használtak transzdukcióra. Az R.m. 41 temperált 16-3 fágjára speciális transzdukciót, míg a 11-es fágja esetében általános transzdukciót irtak le. /1,2/

2/. Konjugáció

Konjugációra képes minden olyan önálló replikonnal rendelkező DNS molekula, amely rendelkezik a konjugációhoz szükséges transzfer génekkel. E transzfer gének résztvehetnek a konjugációban szerepet játszó bakteriális pilusok kialakításában és alapvető szerepük van a plazmid-fehérje un. relaxációs komplexek kialakításában. Ennek alapja, hogy a konjugatív /vagy mobilizálható/ plazmidok tartalmaznak egy un. nic vagy bom DNS szekvenciát, amelynél a plazmid DNS egy szálának elvágódása és a transzferben szerepet játszó un. mob gén/ek/ által kódolt fehérje összekapcsolódása megtörténik. A plazmid DNS-eknek ezt a régióját transzfer origónak is nevezik.

E fehérje-DNS komplex ezek után változatos módokon jut át a bakteriális pilusokon keresztül a receptor baktériumba. A transzfer rendszer elemei, így a bakteriális pilusok is, a konjugatív plazmidok adott csoportjára jellemzőek./3/

A konjugatív plazmidok egy része, mint például a jól ismert E.coli F-/szex/faktor képes a bakteriális kromoszóma egy-egy szakaszának véletlenszerű vagy specifikus mobilizációjára. Az F-faktor közvetítette kromoszómamobilizáción alapuló konjugációs klasszikus genetikai térképezési módszer jól ismert./4/

Az F-faktorhoz hasonló kromoszómamobilizációs képességgel



rendelkezik számos un. R-plazmid is. E plazmidok a kromoszómamobilizáció mellett képesek más, nem konjugatív plazmidok mobilizációjára is. Legtöbb esetben a kromoszómamobilizációs képesség /Cma/ összefügg a plazmidokon található inszerciós szekvenciák un. IS-elemek jelenlétével.

A P1 inkompatibilitási csoportba tartozó R68.45 konjugatív, széles gazdaspecifitású plazmid, mely *Rhizobium meliloti* 41-ben is replikálódik és képes az R.m. 41 kromoszómáját F-faktorhoz hasonlóan mobilizálni. /5,6/

Az R68.45 plazmid közvetítette polarizált kromozomatranszferet használták fel Kondorosi és mtsi. az R.m. 41 kapcsoltságú kromozómatérképének elkészítésére. /7/

Az R68.45 plazmid az R68 /vagy RP4 = R1/ plazmid egy olyan stabil mutánsa, melyben az R68 plazmidon található IS8 inszerciós szekvencia duplikációja fordul elő a plazmid Km^R génjéhez közel. Az R68.45 fokozott kromoszómamobilizációs képessége összefügg az IS8 két kópiában való előfordulásával.

Az IS8 replikációjával együttjáró random transzpozíciója a kromoszóma DNS-be egy további lépésben lehetővé teszi az IS8 kópiát hordozó R68.45 plazmid és a kromoszóma DNS közötti rekombinációt, az R68.45 plazmid időleges integrációját a kromoszóma DNS-be. Az R68.45 plazmid így konjugációja során képes random kromoszómaszakaszokat a recipiens baktériumba mobilizálni. A folyamat intermedier termékei lehetnek olyan nagyméretű un. R' /R-prime/ plazmidok, melyek a kromoszómális DNS nagy szakaszait hordozzák. Ezek az R'-plazmidok bizonyos körülmények között izolálhatók, a konjugációs folyamat során azonban nagy gyakorisággal disszociálnak a donor és recipiens baktériumok homológ kromoszómaszakaszai között

bekövetkező homológ /kettős/ rekombináció eredményeként. Mivel a rekombinációs gyakoriság függ a mobilizált kromoszómaregión méretétől és e régióban kiválasztott markerek távolságától, a módszer alkalmazható genetikai térképezésre.

Az R68.45-tel / és más P1 és Q csoportba /3/ tartozó plazmidokkal/ a kromoszómamobilizáció elvéhez hasonlóan mobilizálhatók nem konjugatív plazmidok Rhizobiumba. A mobilizáció intermedier terméke az R68.45 és az adott plazmid un. kointegrátja, mely a mobilizált plazmid sajátosságaitól függően /pl.: replikálódik-e Rhizobiumban/ a recipiens Rhizobium meliloti 41-ben disszociál vagy stabil kointegrátként fentmarad. Az R68.45 /és hasonlóan R68, RP4/ plazmid mobilizálta nem konjugatív plazmidban mindig megtalálható a kointegrátképzésben alapvető szerepet játszó IS8 szekvencia.

/8,9/

3/. Transzfecció és transzformáció

A génátvitel molekuláris genetikában alapvető fontosságú két módszere a mechanizmusában hasonló transzfecció és transzformáció. Az értekezés tárgyát transzfecció és transzformációs módszerek kidolgozása képezi Rhizobium meliloti 41-re, ezért e módszerek elméletét részletesebben tárgyaljuk.

A transzformáció szemben a transzdukcióval, konjugációval csak néhány baktériumfaj esetében tekinthető természetes génátviteli folyamatnak.

Griffith /10/ 1928-ban írta le a klasszikus bakteriális transzformáció jelenségét a Pneumococcus esetében. Megfigyel-

te, hogy amíg a hővel előlt virulens Pneumococcus S variáns és az avirulens R variáns külön-külön egérbe injektálva nem okoz megbetegedést, a kettő keverékének injektálása az egerek elhullását okozta. Az elhullott egerekből virulens S típusú baktériumot mutatott ki. Az élő R típusú baktérium az előlt S variáns poliszaharid kapszula jellegét valamilyen hordozó illetve mechanizmus közvetítésével felvette. Ezt a tulajdonságban bekövetkezett minőségi változást nevezték transzformációnak.

Bár 1930-ban Dawson /11/ a transzformáció jelenségét más pneumococcusoknál is leírta, 1944-ig, Avery, Macleod és McCarty /12/ transzformáló ágenszt, a DNS-t genetikai anyagként azonosító tanulmányának megjelenéséig lényeges eredmények nem születtek. Így e dátum jelzi a század második felében oly óriási gyorsasággal fejlődő modern genetikai, majd molekulárbiológiai kutatások kezdetét.

A Gram negatív és pozitív baktériumok esetében megismert természetes transzformációs folyamatok alapvetően különbözőek. A transzformáció folyamatát általánosan a következő fő lépésekre oszthatjuk:

- 1/. a sejtek DNS felvevő képességének /un. kompetencia állapot/ kialakulása
- 2/. a DNS kötődése
- 3/. a DNS felvétele
- 4/. integráció előtti fehérje-DNS komplex kialakulása
- 5/. a DNS integrálódása a recipiens baktérium genomjába.

A/. A Gram pozitív baktériumok transzformációja

A Gram pozitív baktériumok közül a transzformáció mechanizmusa *Streptococcus pneumoniae*, *S. sanguis* és *Bacillus subtilis* esetén a legismertebb.

A DNS felvételt lehetővé tevő un. kompetencia állapot ezeknél a baktériumoknál indukálható, kialakulásakor jelentős változások következnek be a génexpresszióban és a sejtmembrán-peptidoglikán szerkezetű sejt falban.

A kompetens állapot létrejöttéért egy, az exponenciálisan növekvő baktérium kultúrákban termelődő aktivátor, vagy un. kompetencia-faktor felelős /13,14/, melyet kimutattak *Streptococcusok*, *Pneumococcusok* és több *Bacillus* faj esetében. A *Streptococcus*nál a kompetencia-faktor egy 5-10 KD mólsúlyú fehérje, mely a sejt felszíni receptorokhoz kötődve indukálja a kompetens állapotra jellemző néhány fehérje /DNS-kötő fehérjék, specifikus endo- és exonukleázok/ szintézisét./15,16/ Kompetens állapotban sejtosztódás nincs, a sejtekben a fehérje és RNS szintézis depresszált, a sejtek hajlamosak autolízisre, ezáltal DNS leadásra is.

A DNS kötődése a kompetens sejtekhez több lépésre osztható folyamat. A nagymólsúlyú DNS a sejt felszínen DNS kötő fehérjékhez kapcsolódhat. A kötődés korai fázisa reverzibilis, a DNS DN-ázra, nyiróerőkre érzékeny. A receptor fehérje endonukleáz aktivitással rendelkezik, a hozzá kapcsolódó DNS-t egyik szálán hasítja első lépésben. A DNS kötő receptor csak kettős szálú DNS kötésére képes, egyes szálú DNS, RNS, kettős szálú RNS és RNS-DNS heteroduplex nem kötődik a fehérjéhez./21-23/ A sejt felszíni DNS kötőhelyek száma *Pneumococcus* esetén 30-80, a kötött DNS-ben 6 Kb-onként keletkezik átlagosan egy egyes szálú hasítás./17-20/ Kétértékű

kationok jelenlétében a DNS másik szálának hasítása is bekövetkezik. Pneumococcusnál a DNS-t kötő receptor-komplex Ca^{2+} függő endonukleáz I-et, Bacillus subtilisnél Mn^{2+} és Ca^{2+} függő membránkötött endonukleázt tartalmaz. Mind a Pneumococcus, mind a B. subtilis rendszerben létezik egy legkisebb kritikus donor DNS hosszúság, mely méret alatt "transzformációs aktivitás" nem mérhető.

A DNS felvétele Mg^{2+} függő, a felvétel folyamata során a DNS DN-áz rezisztens, receptorokról nem elválható formába alakul. A receptor komplexen kötött 6-10 Kb átlagos méretű kettős szálú DNS a membránon való áthaladás során egyes szálúvá alakul. /24,25/ A transzformáló DNS egyik szála leemésződik. A kialakuló egyes szálú DNS membránon való átjutását, egyes szálú konformációjának fenttartását és nukleázokkal szembeni védelmét a kompetens állapotban felhalmozódó, egyes szálú DNS-hez nem kovalensen kapcsolódó fehérjék biztosítják. A kialakult egyes szálú DNS-fehérje komplex izolálható. Mivel a komplex DNS-e újabb transzformációban már nem aktiv, a durván eukarióta nukleosómális szerkezethez hasonlítható fehérje-DNS komplexet un. eklipsz komplexnek nevezik. /26/ A komplex fehérje polimerjének azonos alegységei 70-107 bp hosszúságú DNS szakaszokat fejtnek át, Pneumococcusban 19,5 KD mólsúlyúak. /27/

A kompetens sejtekbe jutott átlagosan 10 Kb /maximum 30 Kb/ hosszúságú DNS integrálódhat a homológ kromoszómális /plazmid/ DNS régiókba. /30,31/ Feltehetően az eklipsz komplex membrán eredetű vezikulákban, un. mezoszómakban vándorol a recipiens kromoszómális DNS-éhez. /28,29/ Az integrációhoz alapvető feltételnek tűnik, hogy a transzformáló DNS az eklipsz komplexben bázispárosodásra alkalmas egyes szálú formában

legyen jelen. Az integrációs, rekombinációs folyamatot mutáns analizissel és inhibitorok alkalmazásával további lépésekre bontották./26,32-34/

Lánckicserélődéssel a transzformáló egyes szálú DNS és a recipiens baktérium homológ DNS-ének komplementer szála között heteroduplex alakul ki. A folyamatban feltehetően a recA gént magábanfoglaló rendszer is részt vesz. A rekombinációs folyamat etidium bromiddal és DNS-gyráz inhibitorokkal gátolható./26,35/ A folyamat a kezdeti, S1 nukleáz érzékeny labilis heteroduplex struktúra létrejöttétől a repair rendszer által kijavított, részben újraszintetizált, a transzformáló DNS-t kovalens kötésben tartalmazó rekombinációs kromoszómaszakaszok kialakulásához vezet./32,34,36/

A recipiens genomba több donor DNS fragment is integrálódhat./31/ A beépülés folyamata gyors, 1-2 perc alatt létrejön a donor-recipiens DNS komplex./37,38/

A transzformáló DNS hosszabb szakaszokon, több egyes bázispárban különbözhet a recipiens DNS komplementer szálától, ezért a rekombinációs régió kialakításában a repair rendszernek jelentős szerepe van./39,40/ A repair enzimek a transzformáló DNS szálát vagy a recipiens DNS komplementer szálát korrigálják. A repair rendszer azonban különböző hatásokkal javít egyes DNS szekvenciákat, tranzíciókat./41/ Ezt jelzi, hogy az egyes kromoszómális markerekkel reprodukálhatóan változó /magas vagy alacsony/ relatív transzformációs gyakoriság értékeket lehet elérni. Az azonos DNS szálon elhelyezkedő markereket egyaránt érinti a korrekció. A hibás bázispárosodás javításában szerepet játszhat bizonyos metilálatlan DNS szekvenciák repair rendszer általi felismerése is.
/42/

B/. Gram negatív baktériumok transzformációja

A Gram negatív baktériumok genetikai transzformációjának mechanizmusa alapvetően különbözik a Gram pozitív baktériumoknál megismert folyamattól. A transzformáció természetes folyamatának lépéseit legjobban a *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella* és *Acinetobacter* nemzetségekben ismerjük.

A Gram negatív baktériumoknál a Gram pozitívaktól eltérően nem mutatható ki fehérje természetű kompetencia-faktor szintézise. A kompetens állapot létrejöttéhez szükséges feltételek baktérium típusonként változnak.

A *Haemophilus influenzae* esetében a kompetens állapot a sejtosztódás gátlásával, - mely nem hat a fehérjeszintézisre - a sejtek 100%-a kompetenssé tehető./43-45/ Alacsony szintű kompetencia a sejtek növekedésének un. log fázisában indukálható cAMP-vel, a kompetens állapot stimulálható inozinnal és laktáttal, kialakulása gátolható fehérjeszintézis inhibitorokkal. A kompetens állapot indukciója *H.influenzae*-ben együtt jár számos új belső és külső membránfehérje szintézisével és a rekombinációs rendszer általános aktiválódásával.

Neisseria gonorrhoeae-nál csak a pilussal bíró sejtek kompetensek, míg az *Acinetobacter* tenyészetek a növekedés stacioner fázisában válnak képessé DNS felvételére.

A legszembevetőbb eltérés a Gram negatív és pozitív baktériumok transzformációs mechanizmusában az, hogy a természetes transzformációs mechanizmussal rendelkező Gram negatív baktériumok képesek a homológ, azonos vagy közeli fajból származó DNS felismerésére és specifikus felvételére. /46-50/ Az idegen fajok DNS-e bár kötődik a kompetens sejt

felszínén, nagy feleslegben sem képes meggátolni a homológ DNS felvételét.

Az *E.coli*-ban pBR322 vektoron klónozott *H.influenzae*, *H. parainfluenzae* kromoszómális DNS fragmentek deléciós mutagenézisét követő szekvencia analízissel /51,52/ megállapítható volt, hogy a homológ DNS specifikus felismeréséért *Haemophilus*-ban egy 11 bp hosszúságú DNS szekvencia /5'-AAGTCGCGGTCA-3'/ a felelős, mely a *Haemophilus* genomban kb. 600-szor ismétlődik. E szekvenciát a kompetens *Haemophilus*-okban specifikus sejtfelszíni receptorok ismerik fel, melyek fehérje komponenseit *Haemophilus*-DNS-agaróz affinitáskromatográfiával tisztították. A DNS felvételében egy további oldható, periplazmatikus DNS-kötő fehérje is szerepet játszik./53/

A receptor-DNS kölcsönhatás egy egyszerű bimolekuláris kölcsönhatásnak látszik kinetikáját tekintve, azaz a kötött homológ DNS mennyisége egyenesen arányos a sejtfelszíni receptorok számával, mely *Haemophilus* esetén 4-8 sejtenként. Így bár a 11 bp-nyi felismerő szekvencia átlagosan 4000 bp-onként előfordul a *Haemophilus* genomban, a felvehető DNS mennyisége korlátozott, mivel minden receptor csak egyszeri DNS felvételi lépésben vehet részt.

A *Haemophilus*-hoz hasonló 11 bp szekvencia idegen DNS-ekben való előfordulási gyakorisága alacsony /pl.: az *E.coli*-ban 2 / genom/, mely a nem homológ DNS-ek homológ DNS-sel szembeni gyenge kompetícióját magyarázza. A transzformáció folyamata alacsony szintű Ca^{2+} jelenlétét igényli. A kompetens sejtek szemben a Gram pozitív baktériumokkal csak kettes szállú DNS kötésére és felvételére képesek.

A kötődés kezdeti, reverzibilis fázisa rövid /kb. 1 perc,

amíg a Gram pozitívekénél az a 30 percet is elérheti/, majd azonnal kialakul az irreverzibilisen receptorhoz kötődő DNS-fehérje komplex.

A felvett kettős szálú DNS védett a sejt exo- és endonukleázaival /igy restriktív rendszerével/ szemben, bár a Gram negatív baktériumoknál a felvétel során nem alakul ki a Gram pozitívekhez hasonló eklipsz komplex. Az eklipsz komplex fehérjének funkcióját feltehetően a Haemophilusban kimutatott periplazmás DNS-kötő fehérje látja el./53/ Emellett kimutatható, hogy a DNS kezdetben membránfelszíni vezikulásterü képződményekhez kötött, melyekkel együtt a sejt belsejébe transzportálódik.

A transzformáló donor DNS-nek csak egyik szála integrálódik a gazda kromoszóma homológ régiójának DNS-ébe /54,55/, míg másik szála degradálódik. Az integráció kezdeti fázisa a heteroduplex jellegzetes ún. szinaptikus szerkezetének kialakulása. A homológ rekombinációban Haemophilusban az E.coli rec rendszeréhez hasonló gének vesznek részt. A Haemophilus rec1 mutánsa az E.coli recA gén mutációjához hasonló fenotípust mutat, bár a DNS felvételt nem gátolja, a transzformációs gyakoriságot 10^6 -onod részére csökkenti, a bejutó DNS gyors degradációját eredményezi. Ezzel szemben a rec2 mutánsokban a bejutó DNS kettős szálú formában stabilan fentmarad, mivel a rec2 gén már az integráció kezdeti fázisát, a recipiens kromoszóma DNS-ben a heteroduplex képzéshez elengedhetetlen egyes szálú régiók kialakulását gátolja. Hasonló hatású, de az általános homológ rekombinációt nem abszolút módon gátolja a KB6 Haemophilus mutáció.

C/. Transzfekeció

Történetileg a transzfekeció vírus/fág DNS felvételét jelenti a kompetens sejtek transzformációs mechanizmusa által. Mivel ez a jelenség egyrészt a bakteriális /un.genetikai/ transzformációhoz hasonló, másrészt a sejtek fág DNS-sel való infekciója után fertőzőképes fágpartikulumok megjelenését eredményezi, ezért nevezték el transzfekeciónak.

/56/ A transzfekeció két módját szokták általánosan megkülönböztetni:

a/. kompetens baktériumok illetve szferoplasztok közvetlen fág DNS-sel való fertőzését /56-59/

b/. az un. helper /segítő/ fág jelenlétében történő indukált fág DNS felvételt.

A korai transzfekeciós rendszerekben a fág DNS-eket a keletkezett fágpartikulumok /infektiv centrum/ és DNS koncentráció összefüggése alapján két típusba sorolták. Az I. típusú fág DNS-eknél az infektiv centrumok száma egyenesen arányos a DNS koncentrációval /58,60/; a II. típusú fág DNS-eknél viszont az infektiv centrumok számát a DNS koncentráció harmadik illetve negyedik hatványával találták arányosnak./61,62/ Reilly és Spizizen korai megállapítása szerint az I. típusú fág DNS transzfekeciójakor kb. $1-2 \times 10^4$ molekula eredményez egy infektiv centrumot, míg a II. típusú fág DNS-nél feltételezték, hogy új fág képződéséhez több mint egy lépés szükséges, mivel a sejtbe jutó fág DNS döntő része degradálódik és ép fág DNS csak a rekombinációs-repair mechanizmus működésének eredményeként keletkezhet a degradációs termékekből./63/

A sejt repair-degradatív funkcióinak szerepére utal az, hogy az un. II. típusú fág DNS felvételekor UV besugárzott sejtek transzfekeciója esetében a II. típusú fág DNS-ekre is az infektív centrum-DNS koncentráció összefüggés lineárisrá vált.

Természetesen a baktériumok, korai transzfekeciós kísérletekben még ismeretlen, restrikiós és modifikációs rendszerre is alapvetően meghatározza a transzfekeció-transzformáció hatásfokát. Ismeretes, hogy a sejtbe jutó fajidegen DNS-t bizonyos baktériumok restrikiós /helyspecifikus I-es és/vagy II-es típusú/ endonukleázai effektíven degradálják, mivel azok nem védettek, nem modifikáltak a restrikiós endonukleáz emésztéssel szemben. A modifikációért felelős enzimek a modifikációs metiltranszferázok, amelyeknek felismerőszekvenciája megegyezik a sejt restrikiós enzimek által felismert 4-6 bp-nyi szekvenciákkal. A modifikációs metilázok a restrikiós endonukleáz felismerőhelyek egyes bázisait specifikusan metilálják a DNS mindkét szálán, úgy, hogy a modifikált DNS a restrikiós endonukleázoknak nem lehet többé szubsztrátja. A restrikiós-modifikációs rendszerek genetikájáról és biokémiájáról alkotott alapismeretekről jó összefoglalást ad Roberts./64/

A Gram negatív és pozitív baktériumok transzformációs mechanizmusának ismeretében a transzfekeciós eredményeket magyarázni tudjuk. A kompetens sejtek a kromoszómális, plazmid vagy fág DNS-t ugyanazzal a mechanizmussal veszik fel.

Gram pozitív baktériumoknál a transzfekeció alacsony gyakoriságát az magyarázza, hogy a fág és plazmid DNS a kromoszómális DNS-hez hasonlóan egyesszálú formába alakul a

felvétel során, mely nem képes replikációra, ugyanakkor homológ szekvenciák hiányában a kromoszómális DNS-be való integrációra sem. Ezért például fág vagy plazmid DNS-sel kromoszómális markerekhez képest a *Bacillus subtilis* 10^3 - 10^4 -szer kisebb gyakorisággal transzfektálható ill. transzformálható.

A Gram negatív *Haemophilus* esetében a transzformációhoz ugyanannak a 11 bp szekvenciának kell előfordulnia a fág vagy plazmid DNS-en, mely alapvetően szükséges a homológ kromoszómális DNS felvétele esetén. Így a plazmid vagy fág DNS-sel végzett *Haemophilus* transzfekeció gyakorisága 10^4 - 10^5 -ede lehet a homológ DNS-sel végzett transzformáció gyakoriságának./66/

D/. Mesterséges transzformációs módszerek

A genetikai manipulációs módszerek fejlődése szükségessé tette a természetes transzformációs rendszerek hátrányos tulajdonságainak kiküszöbölését és nagy hatásfokú, plazmid és fág DNS-ek esetében is alkalmazható transzformációs és transzfekeációs rendszerek kidolgozását.

A logaritmusos fázisú *E. coli* sejtek CaCl_2 kezelésével Mandel és Higa /67/ egy általánosan alkalmazható mesterséges transzfekeációs módszert dolgozott ki. A transzfekeáció alaplépései: a sejtek kezelése 0.1-0.05 M Ca^{2+} jelenlétében 0 C°-on, majd hasonló inkubációs periódus DNS-sel és rövid hő-sokk 37-42 C°-on. Ezek a körülmények nemcsak lineáris *E. coli* DNS felvételére alkalmas kompetens sejtpopulációt indukálnak, hanem alkalmasak plazmid vagy fág DNS-sel végzett nagy gyakoriságú transzfekeáció elérésére is.

A transzfekció körülményeit fág DNS-sel végzett transzfekcióra /68/, genetikai transzformációra /69/ és plazmid transzformációra /70,71,72/ figyelembe véve az egyes E.coli törzsek sajátosságait részletesen kidolgozták. Általános törvényként megállapítható, hogy a transzformációs gyakoriság a plazmid vagy fág DNS méretének növekedésével csökken.

E. colinál a transzformáció Ca^{2+} jelenlétében nem szekvensspecifikus. Telítési és kompetíciós kísérletek eredményei azt jelzik, hogy E. coli esetében körülbelül 200 membrán-csatorna található a Ca^{2+} kezelt sejteken, mely plazmid DNS aktiv felvételére képes. Az alapkörülmények mellett számos monovalens Rb^+ , Li^+ , divalens Mn^{2+} , Mg^{2+} kation jelenléte illetve ezek jelenlétében membrán tranzíciót eredményező szerek, mint a dimetil-szulfoxid /DMSO/, vagy például a hexamin-kobalt/III/ klorid használható a transzformációs gyakoriság emelésére, a folyamat elméleti határértékhez közeli optimalizációjára./73/

A részletes vizsgálatok ellenére mind a mai napig nem ismerjük a Ca^{2+} -mediált mesterséges transzfekció molekuláris mechanizmusát.

A Ca^{2+} kezelés általánosan alkalmazható módszernek bizonyult. Így sikeresen alkalmazható volt Staphylococcus, Pseudomonas vagy Haemophilus transzformációban is.

A Ca^{2+} kezeléstől eltérő speciális eljárás a sejtfal és membrán szerkezetét fagyasztás-melegítés ciklussal megváltoztató módszer, melyet sikeresen alkalmaztak Agrobacterium tumefaciens transzformációjára /74,75/

A Gram pozitív baktériumok transzformálására Chang és Cohen fejlesztettek ki egy rendkívül effektív mesterséges módszert, melyben a peptidoglikán sejtfal lizozim emésztés-

sel való eltávolítása után a plazmid DNS-t polietilén-glikollal indukált protoplasztfúzióval vetetik fel. E módszerrel a túlélő sejtek több, mint 80%-a válik transzformánssá. /76/ Az elért 4×10^7 transzformáns / μg plazmid DNS /4-6. Kb tartományban/ az E. coli transzformációs módszerekhez hasonlóan szintén megközelíti az elméletileg elérhető maximális gyakoriságot.

E/. Transzfekeció és transzformáció Rhizobium fajoknál

A szimbiotikus nitrogénfixálásban résztvevő Rhizobium fajokra az ötvenes évek kezdete óta próbálkoztak transzformációs illetve transzfekeációs rendszereket kidolgozni.

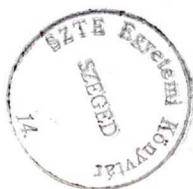
1956-58-ban Balassa és Gábor /77/ irták le Rhizobium lupini sikeres transzformálását /auxotrófia és antibiotikum rezisztencia markereket használva/ tisztított kromoszóma DNS-sel, majd később más laboratóriumok is közölték kromoszómális gének átvitelét tisztított DNS-sel való transzformálással Rhizobium trifolii-ben./78-80/ Ezeket a kísérleteket azonban részletes genetikai analízis nem támogatta és eredményeik nem voltak ismételhetőek.

Transzfekeációs kísérleteket korábban Rhizobiumokra szferoplasztok és kompetens baktériumok fág DNS fertőzésével irtak le. /81-83/ A fág DNS-sel végzett transzfekeációs kísérletekben a fenti szerzők a Rhizobium meliloti 41 kompetens állapotát korai logaritmus fázisban állapították meg és csak rendkívül alacsony transzfekeációs gyakoriságot értek el tisztított fág DNS közvetlen /előkezelés nélküli/ felvételével. Szferoplasztot fertőzve a transzfekeációs gyakoriság

némi növekedését tapasztalták. Kondorosinak és mtsi-nak /84/ sikerült egy olyan helper fágos transzfekciós rendszert kidolgozni és annak genetikai kísérletekben való alkalmazhatóságát bizonyítani, melyben a transzfekciós gyakoriság értéket sikerült 3×10^{-6} transzfectáns / fág ekvivalens DNS értékre emelni.

A helper fágos transzfekciókor a transzfectáló DNS által hordozott marker megjelenését vizsgálják a keletkező új fágokban, tehát a transzfekciós aktivitást egyetlen gén megnyilvánulásán keresztül mérik. /Ez a marker "rescue"/viszszanyerés/ elve./ Ezzel a módszerrel sikerült nem kompetens R. meliloti 41 sejtekkel is DNS-t felvetetniük.

Munkánk kezdetéig megismert transzformációs és transzfekciós módszerek egyike sem tette lehetővé replikálódó /nem konjugatív/ plazmidok vagy / in vitro átalakított/ fág DNS-ek transzfekcióját R.meliloti 41-be, ezért szükségesnek látszott olyan reprodukálhatóan használható transzformációs és transzfekciós módszer kidolgozása, mely alkalmazható R.m.41-ben plazmidon vagy fág DNS-en klónozott kromoszómális, plazmid vagy fág gének molekuláris genetikai analizisében. A fág DNS-ekkel végzett transzfekció elvi lehetőséget biztosítana fágmutánsok közötti komplementáció vizsgálatára, míg plazmid DNS-sel kidolgozott transzformáció segíthetné, más módszerek alkalmazása mellett, kromoszómális, plazmid vagy fág DNS kódolta gének azonosítását és jellemzését.



CÉLKITÜZÉSEK

Rhizobium meliloti 41-re alkalmazható transzformációs és transzfekeciós módszer kidolgozásához célul tűztük ki

- kompetens baktériumpopuláció előállításához alkalmas körülmények vizsgálatát

- az E. colira használt Mandel és Higa szerinti CaCl_2 -os transzformációs módszer adaptálását Rhizobium meliloti 41-re; ezen belül a transzformációt befolyásoló körülmények

- sejtdenzitás, növekedési fázis

- kétértékű ionok $[\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}]$ koncentrációja

- a transzformáláshoz használt DNS eredete /E.coliból vagy R.M. 41-ből tisztított/

- a DNS szerkezete és mérete /cirkuláris, lineáris/

- a DNS koncentrációja

hatásának vizsgálatát a transzformációs és transzfekeciós gyakoriságra.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1/. Baktérium törzsek, fágok és plazmidok

A kísérleteinkben használt baktérium törzsek, fágok és plazmidok jellemzőit az I. Táblázatban foglaltuk össze.

2/. Táptalajok

Rhizobium meliloti 41-re és E.colira a következő komplett és minimál táptalajokat használtuk:

TA: 10 g/l Bacto-trypton, 1 g/l élesztő kivonat, 5 g/l NaCl
1mM MgSO₄, 1mM CaCl₂ /pH 7.5/

GTS: 0.1 g K₂HPO₄, 3g Tris, 1 g NaCl, 0.246 g MgSO₄·7H₂O,
0.011 g CaCl₂, 0.27 mg FeCl₃·6H₂O, 0.242 mg NaMoO₄·2H₂O,
3 mg H₃BO₃, 2.23 mg MnSO₄·4H₂O, 0.287 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.125 mg
CuSO₄·5H₂O, 0.065 mg CoCl₂ és 2 mg biotin /pH 7.5/ 1 l-re

GTA: GTS táptalaj kiegészítve 1g/l élesztőkivonattal,
10 g/l Bacto-tryptonnal és 100 mg /l NH₄Cl-dal

A táptalajok szilárd változatai 2% agart tartalmaztak.

A növényi tesztekhez Gibson táptalajt készítettünk./85/

3/. Antibiotikumok

R. meliloti 41-re a következő antibiotikum koncentrációkat használtuk: Km /kanamicin, Medexport/ 200 µg/ml,
Sm /streptomycin, szulfát, Biogál/ 200 µg/ml, Tc /tetraciklin,
Sigma/ 15 µg/ml, míg E.colira Km 5 µg/ml, Sm 10 µg/ml, Tc
15 µg/ml

I. TÁBLÁZAT

Baktérium törzsek, fágok és plazmidok

Baktérium törzs	Genotípus/Fenotípus	Eredet/Hivatkozás
E. coli		
J53	pro met /pJB3JI	/86/J.E.Beringer
C600	pro /pGV1106/	/8/ J. Leemans
JF1754	met hisB leuB hsdR	J.F.Friesen
GY883	pro /pGV1106//pJB3JI/	
GY940	JF1754 /pKK2/	
GY942	JF1754 /pKK2//pJB3JI/	
R. meliloti 41		
AK631	vad típus	Kondorosi Á.
GY887	AK631/pJB3JI//pKK1//pKK2/	
KK1	AK631 /pKK1/	
KK2	AK631 /pKK2/	
GY888	AK631/pJB3JI//pKK1/	
Plazmidok	Jellemzők	Eredet/Hivatkozás
pGV1106	IncW, Km ^R /Gm ^R Sm ^R /Sp ^R	/8/ J.Leemans
pJB3JI	IncP1 Cma ⁺ Tc ^R	/86/ J.E.Beringer
pKK1	IncW Km ^R /Gm ^R Sm ^R /Sp ^R	
pKK2	" " "	
RP4	IncP1 Km ^R Tc ^R Ap ^R	/88/
pBR322	Tc ^R Ap ^R	/89/
p65	pBR322- R.m.41 13Kb BamHI fragment	Bánfalvi Zs.
R. meliloti 41 fágok	Jellemzők	Eredet/Hivatkozás
16-3 ti5	cti5	/90/
11	mérsékelt, stabil lizogén nincs	/2/ Sik T.

4/. Baktérium törzsek tárolása, növesztése, keresztezése

A baktérium törzseket 20%-os /v/v/ glicerinben, -20C° -on tároltuk, majd tisztításuk és újraellenőrzésük után egy telepről inokulálva 34C° -on rázatva növesztettük.

A baktérium törzsek keresztezését szilárd komplett táptalajon végeztük. Éjszakán át növesztett kultúrákból, a donorból és recipiensből 0.1-0.1 ml-t cseppentettünk egymást követően egymásra TA agar lemezekre és 34C° -on éjszakán át növesztettük. A felnőtt baktériumpázsitot 5 ml 0.9% NaCl oldatban felfuszpendáltuk, majd a konjugációs elegy megfelelő hígításait szelektív lemezekre szélesztettük.

5/. Agaróz gélelektroforézis

A DNS-eket és DNS fragmenteket méret szerint 0.7-1.5% agaróz géleken végzett elektroforézissel választottuk el horizontális elektroforézis készülékekben. Az agaróz gélelektroforézishez TEA /40mM Tris.acetát /pH 8.05/, 20mM Na-acetát, 1mM EDTA / puffert használtunk. A DNS mintákat 0.1 térfogat festékkoldattal /50% szaharóz, 0.2M EDTA, 0.02% brómfenolkék/ kiegészítve vittük gélre, majd az elektroforézist 3-4 órán át 80 V/80mA-rel vagy éjszakán át 12-20 V/ma-rel végeztük. Molekulasúly standardként HindIII emésztett λ CI 857 fág DNS-t használtunk.

6/. Restriktíós endonukleáz emésztés, T₄-ligáz reakció, alkalikus foszfatáz kezelés

a/. A restriktíós endonukleázokkal végzett emésztések

reakcióelegyeit az emésztett DNS mennyiségének illetve az adott enzimoldat töménységének megfelelően állítottuk össze.

/ Egy egység restriktív endonukleáz 1 óra alatt, 37°C -on $1\ \mu\text{g}$ a DNS-t képes megemésztetni. Töménység alatt az enzim $1\ \mu\text{l}$ -ére eső egységek mennyiségét értjük./ Az egyes enzimekre a következő puffereket használtuk:

1/. BamHI, EcoRI, SalI, XbaI, XhoI: 50mM Tris.HCl/pH 7.5/, 10mM MgCl_2 , 150mM NaCl, 1mM dithiotreitol/DTT/ /H-puffer/

2/. PstI, HindIII: 10mM Tris.HCl /pH7.5/, 10mM MgCl_2 , 50mM NaCl, 1mM DTT /M-puffer/

3/. KpnI, BglIII, HpaI: 10mM Tris.HCl /pH7.5/, 10mM MgCl_2 , 1mM DTT /L-puffer/

b/. A DNS 5'-foszfát és 3'-OH csoportjait foszfodiészter kötéssé ligálásához T4 fág DNS ligázt használtunk. A ligálásokhoz az endonukleáz kezelést követően a restriktív enzimet hőinaktiváltuk 67°C , 10 perc/ vagy fenol, fenol: kloroform:i-amilalkohol /25:24:1/ kirázással tisztítottuk a DNS-t, majd 0.3M Na-acetát jelenlétében $0.6\text{-}1.0$ térfogat i-propanollal /30 perc, szobahőn/ vagy $2\text{-}2.5$ térf. etanollal -70°C , 5-15 perc/ precipitáltuk. A feloldott DNS mintákat 50mM Tris.HCl /pH7.4/, 5mM MgCl_2 , 1mM DTT és 0.1mM ATP pufferben $0.2\text{-}10$ egység T4-ligázzal $13\text{-}14.5^{\circ}\text{C}$ -on éjszakán át ligáltuk, rendszerint $20\ \mu\text{l}$ térfogatban.

c/. A ligálás során a DNS-ek saját cirkularizációjának megakadályozása céljából a vektor plazmid DNS-ek 5'-végeiről a foszfát csoportot alkalikus foszfátázzal távolítottuk el, a DNS-t 10mM Tris.HCl /pH9.0/, 10mM MgCl_2 , 1mM ZnCl_2 , 10mM spermidin pufferben 37°C -on 30-60 percig marha intesztin foszfátázzal. Egyes esetekben a foszfátáz reakciót két lépésben végeztük, 15 perc emésztés után újabb aliquot enzimmel

a DNS-t 56 C° -on újabb 15 percig emésztettük, majd fenol, fenol-kloroform extrakcióval tisztítottuk és kicsaptuk.

7/. Plazmid izolálási módszerek

a/. A pGV1106 és származékainak izolálásához 1 l komplett tápfolyadékban megfelelő antibiotikum /Km és Sm/ jelenlétében növesztett sejteket centrifugáltuk, majd a plazmidokat Birnboim és Doly/91/ alkalikus lizisen alapuló plazmidtisztítási módszerének módosított változata szerint preparáltuk.

A sejteket 30ml 50mM Tris.HCl /pH 8.0/, 10mM EDTA, 50mM glükóz, 2mg/ml lizozim /TEG/ pufferben szuszpendáltuk és 30 percig jégen állni hagytuk. A képződött szferoplastokat 60 ml 0.2N NaOH, 1% SDS oldattal lizáltuk / 0 C° , 5 perc/, a kromoszómális DNS denaturáltuk. A denaturált DNS-t és a fehérjék egy részét 45 ml 3M Na-acetát /pH 4.8/ adásával 1 órán át jégen precipitáltuk, majd a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk / Sorwall RC5, GS3 rotor, 9000 rpm, 30 perc, 0 C° /. A plazmidtartalmú felülúszóhoz 0.5 térfogat TE pufferrel telített fenolt adtunk, majd a vizes fázist 0.5 térfogat kloroform:i-amilalkohol /24:1/ adásával szétválasztottuk a fenolos fázistól. A vizes fázist ismételtén kiráztuk kloroform:i-amilalkohol keverékével 0 C° -on, majd a plazmidtartalmú vizes fázist rövid centrifugálás után összegyűjtöttük és a DNS-t egyenlő térfogatú i-propanollal /30 perc, -20 C° / kicsaptuk. A DNS csapadékot centrifugáltuk / Sorwall GS3 rotor, 8000 rpm, 20 perc, 0 C° /, majd a csapadékot etanollal mostuk és szárítottuk.

A DNS csapadékot 23.5 ml TE /50mM Tris.HCl /pH 8.0/,

20mM EDTA/ pufferben oldottuk, 24g cézium klorid és 1.5ml /10mg/ml/ etidium bromid adása után az esetleg megjelenő csapadékot centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót Sorwall TV 850 vertikális rotorban 40 Krpm-mel centrifugáltuk 15 C°-on. A kialakuló /20 óra/ CsCl-etidium bromid sűrűségi egyensúlyi gradiensről a plazmid, lineáristól jól elkülönülő ún. supercoiled /cirkulárisan, kovalensen zárt/ formáját tartalmazó DNS sávot leszivtuk, majd /Sorwal TV 865 vertikális rotorban, 48 Krpm-mel, 15 C°-on 12 óráig/ újabb gradiensben tisztítottuk. Az összegyűjtött tisztított plazmid DNS-ből az etidium bromidot egymást követő 20 x SSC-vel telített i-amilalkoholos extrakciókkal eltávolítottuk. A DNS oldatot ezután vízzel kétszeres térfogatra hígítottuk, majd 0.3M Na-acetát jelenlétében a DNS-t 0.6 térfogat i-propanollal kicsaptuk. Más esetekben a DNS oldatból a cézium kloridot 10mM Tris.HCl /pH7.5/, 10mM NaCl, 1mM EDTA pufferrel szembeni dializissel távolítottuk el.

b/. A plazmidszármazékok gyors tesztjét 1.5ml baktérium-tenyészetből a fenti eljáráshoz hasonlóan, lényegében Birnboim és Doly /91/ szerint végeztük. Röviden: az 1.5ml tenyészetből lecentrifugált baktériumokat 100 µl TEG oldatban 5 mg/ml lizozimmal kezeltük /0 C°, 5 perc/, majd 200 µl 0.2N NaOH, 1% SDS oldattal lizáltuk /0 C°, 5 perc/. A lizátumot 150 µl 3M Na-acetáttal /pH 4.8/ neutralizáltuk, 1 órát jégen állni hagytuk, majd centrifugáltuk. A felülúszóból a DNS-t 1 ml 95%-os etanollal /-20 C°, 30 perc/ kicsaptuk, centrifugáltuk, a csapadékot 100 µl 50mM Tris.HCl /pH 8.0/, 0.1 M Na-acetát pufferben feloldottuk, majd 250 µl 95%-os etanollal /5 perc, -20 C°/ ismét kicsaptuk. Ezt a lépést a DNS újbóli centrifugálása után megismételtük, majd a DNS

csapadékot szárítottuk és 30-40 µl 80 µg/ml RN-ázt tartalmazó desztillált vízben vettük fel és közvetlenül használtuk endonukleáz emésztésekhez és elektroforézishez.

8/. A Rhizobium meliloti 41 11-es fág DNS-ének tisztítása

A R.m. 41 11-es fágját Sik-szerint /87/ dúsitottuk és tisztítottuk lépcsős és folytonos CsCl sűrűségi gradiensen. A cézium kloridtól dializált tömény / 10^{12} - 10^{13} fág/ml/ fág-szuszpenziót 50mM Tris.HCl /pH8.0/, 0.1M EDTA, 0.1M NaCl pufferrel telített fenollal extraháltuk óvatosan és az extrakciót kétszer megismételtük. A fág DNS-t 10mM Tris.HCl /pH 7.5/, 10mM NaCl, 1mM EDTA pufferrel szemben dializáltuk, majd a DNS koncentrációjának spektrofotométeren való meghatározása után / $OD_{260} 1.0 = 50 \mu\text{g/ml}$ kettős szálú DNS/ a fág DNS megfelelő hígításait használtuk transzfekciós kísérleteinkben.

9/. A Rhizobium meliloti 41 transzfekciójának és transzformációjának általunk kidolgozott általános sémája

A Rhizobium meliloti 41 un."kompakt" változatát /AK631/ 200 ml 0.3M szaharóz tartalmú TA tápfolyadékban éjszakán át növesztettük, majd 1:20 hígítást követően / $OD_{540} = 0.05$ / 4-6 órát növesztettük $6-8 \times 10^8$ sejt/ml / $OD_{540} = 0.5$ / denzitásig. A tenyészetet lehűtöttük és a sejteket centrifugálásal összegyűjtöttük / Janetzky K23, 4000 rpm, 0 °C, 10 perc/, majd 20 ml 100mM MgCl₂ oldatban felszuszpendáltuk és 10 percig jégen inkubáltuk. A sejteket ezt követően ismét lecentrifugáltuk, 2 ml 0.15 M CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk.

30 perc jégen való inkubáció után a baktériumszuszpenzió 0.2 ml-éhez 0.1 ml 0.15M CaCl_2 : 1 x SSC /4:3/ oldatban 1-1.5 μg plazmid vagy fág DNS-t adtunk és 60 percig jégen inkubáltuk. A sejteket ezután 1.5 percig 40 C° -os hősokkal kezeltük, majd a hősokkot követően 30 percig ismét jégen állni hagytuk.

Fág DNS-sel végzett transzfekciónál ezután az elegyből 0.1-0.1 ml-eket 2ml TA 0.7%-os fedőagarban TA agarra lemezteltük, majd 24 óra után meghatároztuk a megjelenő infektív centrumok számát.

Plazmid DNS-sel végzett transzformáció esetén a transzformációs elegyet 2ml TA táptalajjal hígítottuk és a plazmid kódolta antibiotikum rezisztenciagének fenotipikus expressziójának elősegítése céljából 2 óráig 34 C° -on ráztattuk. Ezután a sejteket centrifugáltuk, 0.5 ml TA táptalajban szuszpendáltuk és 0.1-0.1 ml-enként GTA vagy TA lemezekre szélesztettük, melyek 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamicin és streptomycin szulfátot tartalmaztak. A lemezeket 3 napig 34 C° -on inkubáltuk, majd meghatároztuk a kinövő telepek számát.

10/. E.coli transzformáció

E.coli kompetens sejtek transzformációját a fentiekhez hasonlóan Mandel és Higa-féle /67/ transzformáció módosított változatával végeztük.

Az éjszakán át nőtt JF 1754 sejteket 1:20 arányban hígítottuk, $\text{OD}_{540} = 0.5 = 4-5 \times 10^8$ sejt/ml denzitásig növesztettük. 80 ml kultúrából rövid centrifugálással összegyűjtött sejteket 20ml 0.1M MgCl_2 oldatban / 0 C° -on/ szuszpendáltuk, 5ml-enként vékonyfalú üveg centrifugacsövekben ismét centrifugáltuk, majd 1 ml 0 C° -os CaCl_2 oldatban szusz-

pendáltuk és minimum 1 órát /max. 24 órát/ jégen állni hagytuk. A DNS-t 0.5 ml 0.1M CaCl_2 : 1 x SSC /4:3/ oldatban adtuk a sejtekhez, majd 1 óra $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on való inkubálás után $42\text{ }^\circ\text{C}$ -on a sejteket 2.5 percig hősokkoltuk. A hősokk után az elegyet azonnal lehűtöttük jégen és 5-10 percig állni hagytuk.

A sejteket 5 ml TA táptalajjal hígítottuk, $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 2 órát rázatás mellett inkubáltuk, majd centrifugáltuk és 0.5 ml friss TA médiumban szuszpendáltuk. Szelektív lemezekre 0.1-0.1 ml sejtuszpenziót szélesztettünk és a lemezeket a kolóniák megjelenéséig /12-14 óra/ $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk.

11/. Növényi teszt

A Rhizobium meliloti 41 törzsek effektivitásának vizsgálatához a növényi tesztet /85/-szerint steril lucerna növényekkel végeztük. A lucerna magokat 10 percig 96%-os etanolban, 3 percig 0.2%-os HgCl_2 oldatban sterilizáltuk, majd desztillált vízzel háromszor mostuk. A vizes mosást többször, intenzív rázással megismételtük. A magokat 12.5%-os Na-hipoklorit /Hypo/ oldattal 3 percig utósterilizáltuk, majd 5-8-szor desztillált vízzel mostuk és ezután 0.8%-os vizes agaron sötétben csiráztattuk. A 2-3 napos csiranövényeket Gibson ferde agart tartalmazó kémcsövekbe vittük át és éjszakán át TA tápfolyadékban neveltük, Gibson táptalajjal mosott, abban készített 1×10^8 sejt /ml denzitású Rhizobiummal fertőztük. Egy-egy baktérium törzs tesztjéhez 5-5 növényt használtunk. A növényeket üvegházban $23-28\text{ }^\circ\text{C}$ -on neveltük napi 16 órás megvilágítás mellett. 8 hét után megszámoztuk a megjelenő gümöket a vad , KK1 és KK2 Rhizobium törzsekkel fertőzött lucernákon. Kontrollként nem fertőzött növényt

használtunk. A Rhizobium törzsek effektivitását leegyszerűsítve értékeltük a növények fejlettségét /zöld levelek száma, növény magassága/ alapul véve, mivel kísérleteinkből levonandó következtetések nem tették szükségessé az effektivitást pontosan jellemző szárazsúly és acetilén-redukció értékek meghatározását.

12/. DNS jelölése nick-transztlálással

Eppendorf centrifugacsőben etanolos oldatból leszárított 20-50 μCi $\alpha\text{-P}^{32}/\text{dATP}$ -t /spec.akt. 1500-2000 Ci/mmól/ 11.5 μl , a jelölendő DNS-t tartalmazó desztillált vízben oldottunk fel. A reakcióelegy elkészítéséhez 2 μl 10 x koncentrált nick-transztlációs puffert / 0.5M Tris.HCl /pH 7.4/, 0.1M MgCl_2 , 10mM DTT, 500 $\mu\text{g/ml}$ marha szérum albumin/, 2-2 μl 0.25mM dTTP, dCTP és dGTP oldatot, valamint 0.5 μl /1-4 egység/ E.coli DNS polimeráz I /Klenow fragment/ enzimet mértünk össze. A reakcióelegyet 15 $^{\circ}\text{C}$ -on 60 percig inkubáltuk, majd a reakciót 25mM EDTA-val leállítottuk. A jelölt DNS-t a beépületlen szabad $\alpha\text{-P}^{32}/\text{dATP}$ -től Sephadex G-50/Superfine/ oszlopon választottuk el 50mM Tris.HCl /pH 8.0/, 10mM EDTA, 0.5M NaCl, 0.1% SDS puffert használva, majd a tisztított, jelölt DNS próbát tartalmazó oldatot 100 $^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig inkubáltuk a DNS denaturálása céljából.

13/. Kolóniahibridizáció

a/. A kolóniahibridizációt lényegében Grunstein és Hogness módszere szerint végeztük./92/ A baktérium kolóniákat párhuzamosan, azonos elrendezésben, két-két TA lemezre helye-

zett steril nitrocellulóz filteren növesztettük fel.

A hibridizáláshoz az egyik filteren lévő kolóniák DNS-ét 0.5N NaOH, 1.5M NaCl oldattal 5 percig denaturáltuk, majd a lúgot 0.5M Tris.HCl /pH 7.0/, 1.5M NaCl oldattal kétszeri csösz mellett / 2x5 perc/ neutralizáltuk. A denaturált baktérium / plazmid / DNS-t 80 C°-on vákumszekrényben 2-3 óras inkubálással irreverzibilisen a nitrocellulóz filterre kötöttük. A másik filtert hordozó törzs lemezt a hibridizáció eredményének értékeléséig 4 C°-on tároltuk.

b/. Előhibridizálás

Az előhibridizációs oldattal nedvesített filtereket plastik fóliazsákokba forrasztottuk és a 7-8 ml előhibridizációs oldattal / 50% formamid, 50mM NaH₂PO₄ /pH 7.0/, 200 µg/ml denaturált borjú timusz DNS, 50 µg/ml E.coli DNS /denaturált/, 3 x SSC, 0.1% Ficoll /400.000/, 0.1% polivinilpirrolidon /PVP 360.000/, 0.1% marha szérum albumin/ 42 C°-on 6 órát inkubáltuk. /1 x SSC = 0.15M NaCl, 0.015M Na-citrát /pH 7.0//

c/. Hibridizáció

A nick-transzlációval jelölt, frissen denaturált DNS próbát 10ml hibridizációs elegyben /50% formamid, 50mM NaH₂PO₄, 3 x SSC, 0.2% Ficoll, 0.2% PVP, 0.2% marha szérum albumin /BSA/ 200 µg/ml borjú timusz DNS /denaturált/, 0.1 g/ml dextranszulfát/ az előhibridizált filterekre mértük, majd 42 C°-on 24 órát inkubáltuk. A hibridizálás után a filtereket 2 x SSC, 0.1% SDS oldattal mostuk 4-6-szori csere mellett 67 C°-on 30 perces időtartamokkal, majd 0.1% SDS, 0.1 x SSC oldattal kétszer 30 percig. Ezután a filtereket rövid ideig vákumban szárítottuk. Az autoradiográfiához Forte XR

illetve Kodak X-OMAT R röntgen filmet használtunk. 10-16 óra, -20 C° expozíció után az autoradiográfiás filmen feketedést mutató, pozitív hibridizálási eredményt adó kolóniákat a kontroll, törzs lemezen azonosítottuk és használtuk további analízisre.

EREDMÉNYEK

1/. Transzfekciós rendszer kidolgozása Rhizobium meliloti 41-re

A Rhizobium meliloti 41 kompetenssé tételének alapja az volt, hogy a sejteket 0.3M szaharózzal kiegészített komplett táptalajban növesztettük. Ebben a tápfolyadékban előnövesztve a Rhizobium meliloti 41-et jó hatásfokkal tudtuk protoplaszttá alakítani korábbi protoplaszt transzfekciós előkísérleteinkben.

Kísérleteink során a Rhizobium meliloti 41 egy kompakt változatát használtuk recipiensként, mivel ez a vad típusú Rhizobium meliloti 41-nél kevesebb poliszaharidot termel. Ilyen kompakt szerkezetű baktérium telep bármely mutáns vagy vad típusú Rhizobium szélesztése során izolálható.

A 0.3M szaharóz ozmótikumban előnövesztett Rhizobium meliloti 41-et a Mandel és Higa által /67/ E. colira plazmid DNS-sel leirt Mg^{2+} és Ca^{2+} kezelés kisebb módosításával tudtuk bizonyos mértékig kompetenssé tenni R.m.41 fág DNS felvételére.

A 11-es fág a Rhizobium meliloti 41 temperált fágja, DNS-e 41 Mdalton mólusúlyú. Mérsékelt karaktere ellenére nem képez stabil lizogéneket. Ezzel a fág DNS-sel sikerült elfogadható transzfekciós gyakoriság értéket elérni.

Az alkalmazott módszer egyes lépéseinek vizsgálatát a következő kérdésekre választ keresve végeztük el:

- A transzfekciós ráta a Rhizobium meliloti 41 növekedé-

sének melyik fázisában a legmagasabb

- A Mg^{2+} ionok jelenléte mennyiben szükséges a sikeres transzfekcióhoz
- a transzfekciós gyakoriság értéket a Ca^{2+} koncentráció hogyan befolyásolja
- hogyan függ a transzfekciós gyakoriság a 11-es fág DNS transzfekciós elegybani koncentrációjától
- szükséges-e a hősokk a sikeres transzfekcióhoz.

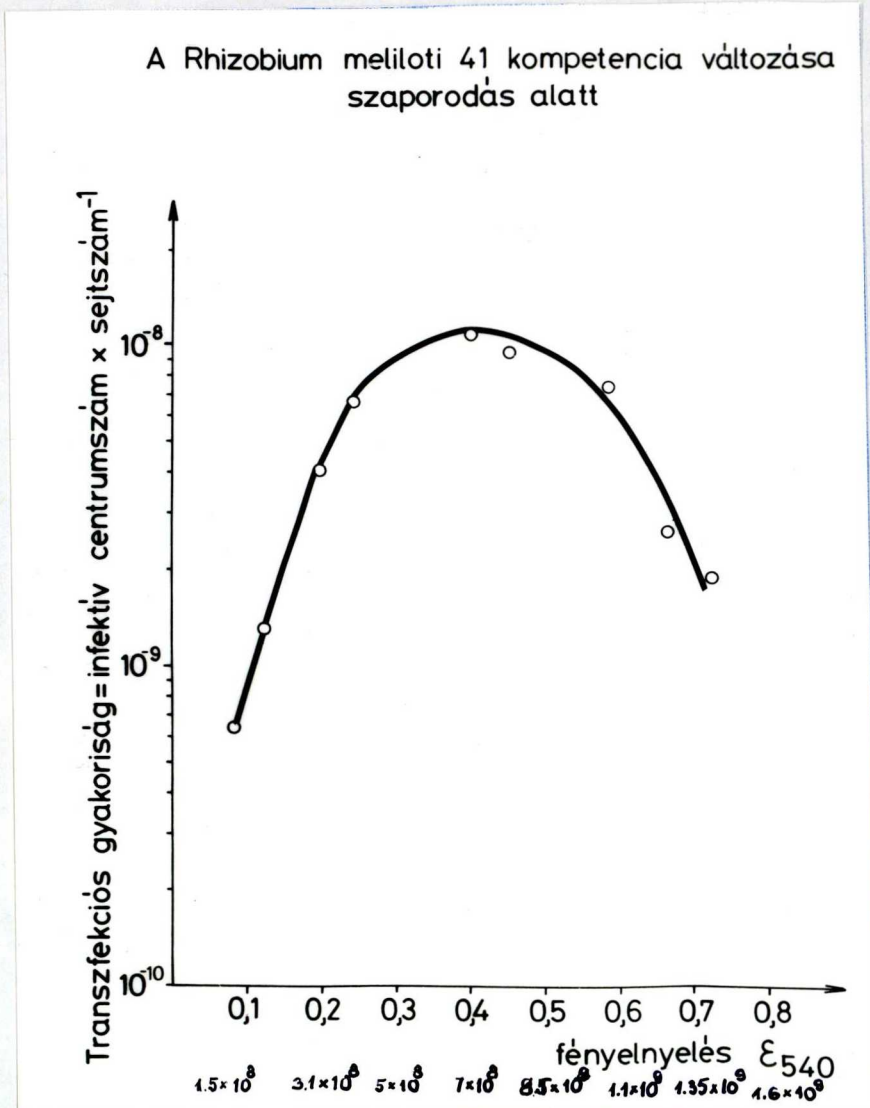
1.1. A Rhizobium meliloti 41 sejtek kompetencia állapotának változása a növekedés különböző fázisaiban

A kísérlet során egy telepről indított baktériumtenyészetből a log fázis kezdetétől a stacioner fázisig különböző sejtdenzitás értékeknél mintát véve, konstans sejtszámú transzfekciós elegyeket előállítva transzfekciót végeztünk $0.1M CaCl_2$, $0.1M MgCl_2$ kezelést követő 1 óras DNS-sejt inkubációt, majd 2 perc $42\ C^{\circ}$ hősokkot alkalmazva. A Rhizobium meliloti 41-re előzetesen elkészített növekedési, valamint OD_{540} - sejtszám összefüggések görbéiről leolvasott értékek alapján konstans /pl.: 5×10^9 sejt/ml/ sejtszámot tartalmazó kultúrát centrifugáltunk le a kísérlet mintáiként és ugyanakkor a mintákban meghatároztuk az élősejtszámot.

Kísérletünk eredményeként azt találtuk, hogy a legkedvezőbb kompetencia állapotot a Rhizobium meliloti 41 körülményeink között $6-8.5 \times 10^8$ sejt/ml denzitással jellemezhető logaritmikus növekedési fázisban éri el. /Ez az $OD_{540} = 0.35-0.5$ értékeknek felel meg.//1.ábra/

A sikeres transzfekcióhoz, fág DNS felvételhez elenged-

A Rhizobium meliloti 41 kompetencia változása szaporodás alatt



1.ábra A Rhizobium meliloti 41 sejtek kompetencia állapotának vizsgálata. Az ábrán a sejt denzitás /sejt-szám/ml/ és extinkció /OD₅₄₀/ értékek megfeleltetését tüntettük fel az abszcisszán, míg az ordinátán a transzfekeiós kiválasztott állandó körülményei mellett a sejtdenzitástól függő transzfekeiós gyakoriság értékeket ábrázoltuk. /állandó összsejtszám mellett 1 µg 11-es fág DNS használatakor kapott infektív centrumok száma/

hetetlenül szükséges a 0.3M szaharóz ozmótikumban történő előnövesztés. A komplett táptalaj szaharóz kiegészítés nélkül nem alkalmas a tenyészetek transzfekcióhoz való kondicionálására. E feltétel betartása nélkül végzett kontroll transzfekciós kísérleteinkben, 7×10^8 sejt/ml választott előnövesztési sejtdenzitásnál egyetlen plakkot sem kaptunk. A legjobb eredményeket akkor értük el, ha éjjelen át növesztett baktérium tenyészetet 1:20 arányban visszahígítottunk friss 0.3M szaharózt tartalmazó TA táptalajban és 2-3 generációs időnek megfelelő 4-6 órát rázattuk 34°C -on. Így biztosítható volt fiatal, némileg szinkron $6-9 \times 10^8$ sejt/ml/ DNS felvételre reprodukálhatóan alkalmas kompetens tenyészet.

1.2. A Mg^{2+} és Ca^{2+} ionok hatása a transzfekció gyakoriságára

a/. Az előkezelésben alkalmazott MgCl_2 kezelés hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a MgCl_2 -os mosás elengedhetetlenül szükséges a sikeres transzfekcióhoz. Mg^{2+} ionok jelenléte nélkül a transzfekciós gyakoriság a spontán transzfekciós gyakoriság értékére 10^{-10} plakk/ μg DNS adott sejtdenzitásnál/ csökken. A mosásnál alkalmazott 0-500mM MgCl_2 koncentrációsorozat /50mM-os lépcsőnként felfelé haladva/ az 50-150mM tartományban közel azonos transzfekciós gyakoriság értékeket adott.

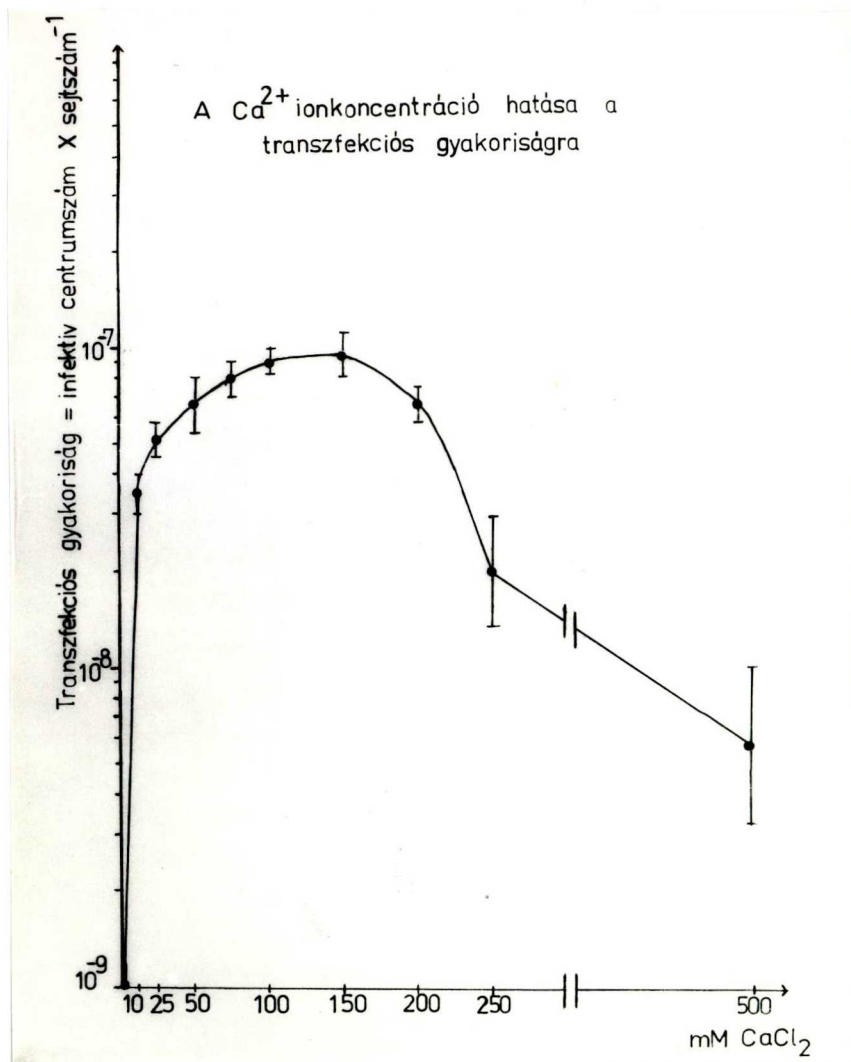
b/. A Ca^{2+} ionkoncentráció hatását 10-500mM tartományban vizsgáltuk, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 és 500mM lépcsőket használva. A $6-8 \times 10^8$ sejt/ml / $\text{OD}_{540} = 0.4-0.5$ / denzitásig növesztett tenyészetekből a sejteket 100mM MgCl_2 mosás után

0.1 térfogatnyi különböző koncentrációjú CaCl_2 oldatban inkubáltuk 30 percig $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A legmagasabb transzfekeciós gyakoriságot 150mM CaCl_2 alkalmazása mellett lehetett elérni. 200mM CaCl_2 koncentráció felett a transzfekeciós gyakoriság értéke fokozatosan csökkent. CaCl_2 kezelés nélkül a transzfekeciós ráta két nagyságrenddel csökkent. /2.ábra/

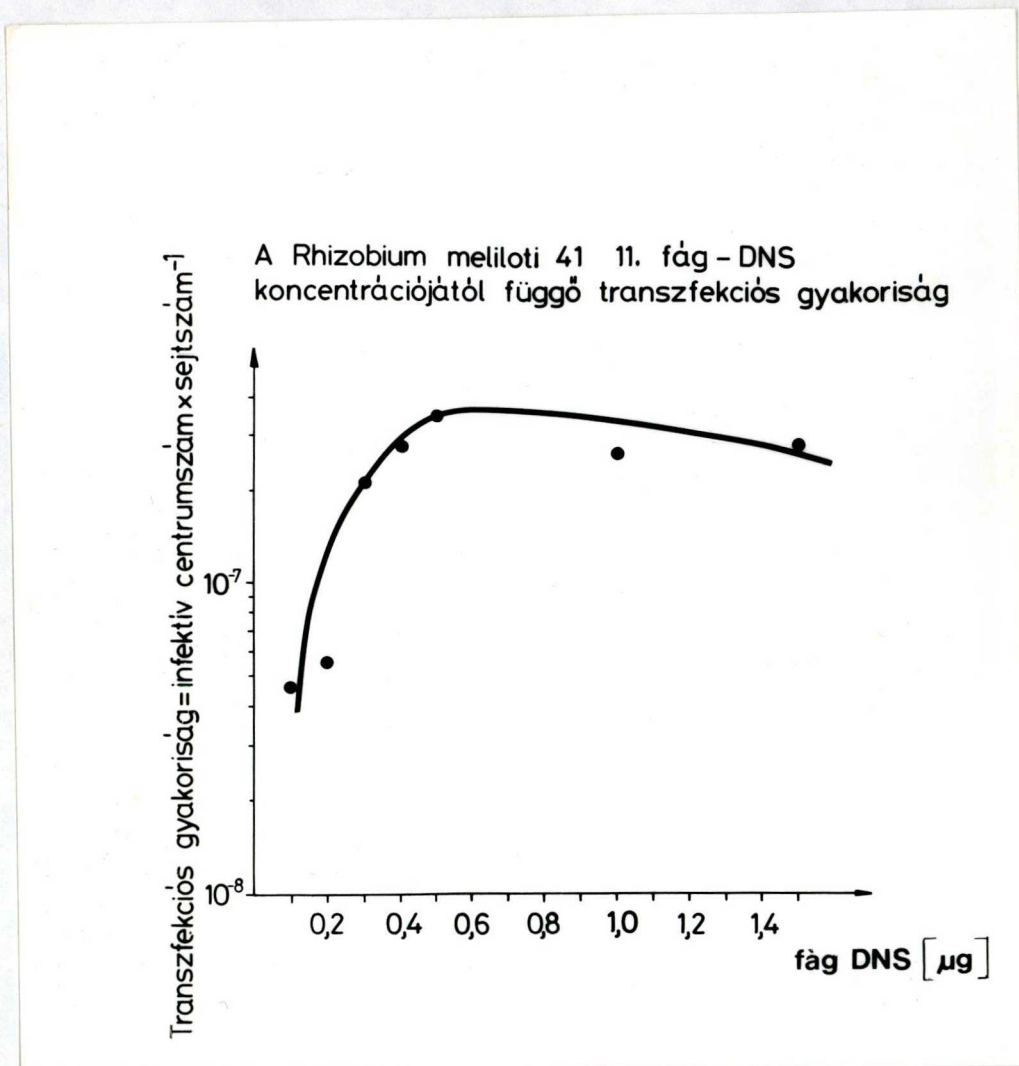
1.3. A DNS koncentráció változása és a transzfekeciós gyakoriság közötti összefüggés vizsgálata

A telítési DNS koncentráció meghatározására 0.1-1.5 μg 11-es fág DNS / transzfekeciós elegy /0.33-5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ / tartományban készített higitási sorozattal végeztünk transzfekeciót úgy, hogy a transzfekecióhoz a kompetens sejteket az előző kísérletekben megállapított denzitási értékig növesztettük. A kompetens sejteket 100mM $0\text{ }^\circ\text{C}$ -os MgCl_2 oldattal mostuk, majd 150mM CaCl_2 jelenlétében 30 percig $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Ezt követően a sejteket különböző mennyiségű 11-es fág DNS-sel inkubáltuk, azonos térfogatban /0.3 ml/, 1 óráig $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on, $42\text{ }^\circ\text{C}$ -on 2 percig hősokkoltuk, majd 15 percig $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk.

A DNS koncentráció transzfekeciós gyakoriság összefüggés telítési görbéjének érintője a 0.4 μg DNS / transzfekeciós elegy /1.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 11-es fág DNS- kompetens sejt elegy/ értéket határozta meg. E feletti DNS mennyiség használatakor a transzfekeciós gyakoriság lényegében nem emelkedett. Következésképpen a korábbi kísérletekben alkalmazott 1 μg DNS-sel kapott transzfekeciós gyakoriság értékek már a telítési tartománynak feleltek meg. /3.ábra/



2. ábra A CaCl_2 koncentráció hatása a transzfekeiós gyakoriságra. Az abszcisszán a használt CaCl_2 koncentráció értékeket, míg az ordinátán a transzfekeiós standard körülményei között kapott transzfekeiós gyakoriság értékeket tüntettük fel.



3. ábra A transzfekeciós gyakoriság változása a DNS koncentráció függvényében. A vízszintes tengelyen a transzfekeciós elegyhez adott DNS mennyiségét, a függőleges tengelyen a kapott transzfekeciós gyakoriság értékeket tüntettük fel.

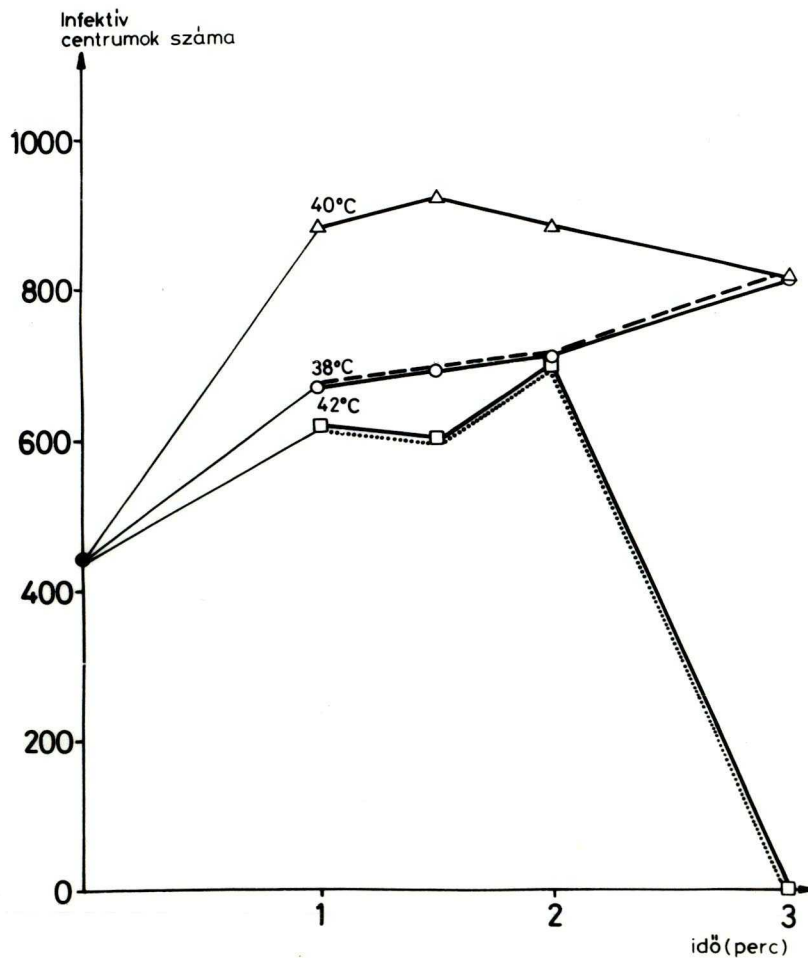
A 3. ábra telítési görbájén feltüntetett értékek egyetlen DNS készítménnyel nyert párhuzamos kísérletek adatait reprezentálják. Tapasztalataink szerint az elérhető transzfekeciós gyakoriság értékek, másszóval a telítési DNS koncentráció értékek, nagymértékben függenek a DNS preparátumok minőségétől is.

A transzfekeciós gyakoriság értéke különböző mérőszámokkal adható meg. Így például esetünkben a fágokvivalens DNS értékre megadott transzfekeciós gyakoriság /= infektiv centrumok száma / fágokvivalens DNS / 10^{-8} , az összsejtszámra vonatkoztatott transzfekeciós gyakoriság értéke /= infektiv centrumok száma / össz sejtszám / 10^{-7} , míg az egységnyi mennyiségű transzfekeciós DNS-re megadott transzfekeciós gyakoriság /= infektiv centrumok száma / μg DNS / értéke $1-5 \times 10^3$ fág / μg 11-es fág DNS értéknek felel meg.

1.4. A hősokk hatása a transzfekeciós gyakoriságra

A hősokk-hatás vizsgálatánál a transzfekeciós elegyben 5×10^9 sejtet inkubáltunk, az előkezelési körülmények meghatározott optimális értékei mellett, $1 \mu\text{g}$ 11-es fág DNS-sel 1 óráig 0°C -on, majd a sejteket 1-3 percig 38° , 40° és 42°C -on hőkezeltük. A hőkezélést követően a mintákat azonnal lehűtöttük és további 30 percig jégen inkubáltuk. A relative legmagasabb transzfekeciós gyakoriság illetve infektiv centrum szám értéket a 40°C -on 1.5 percig tartó hőkezelés esetében kaptuk. /4. ábra/ A hősokk nélküli, 0°C -on tartott kontrollhoz viszonyítva 2-3-szoros növekedést kaptunk az infektiv centrumok számában a 40°C -on végzett

Hőkezelés hatása a transzfeckcióra



4.ábra A hőkezelés időtartamának és az alkalmazott hőmérséklet hatásának vizsgálata az infektiv centrumok számának alakulására . Az abszcisszán a különböző hőmérsékleten végzett hőkezelések időtartamát, az ordinátán az infektiv centrumok számát tüntettük fel.

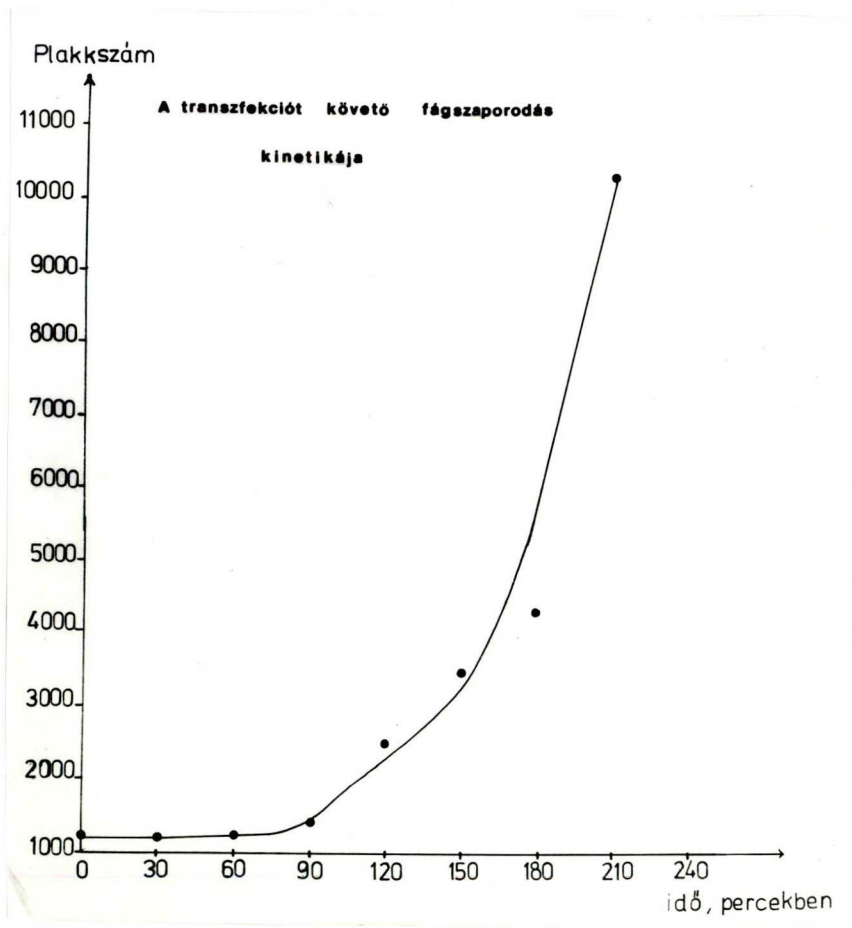
hősokkot követően. 42 C° -on végzett hősokk az infektív centrumok számának drasztikus csökkenését eredményezi 2 perc időtartamot követően. Összefoglalva a kapott eredményeket megállapíthatjuk, hogy a hősokk nem szükséges abszolút módon a transzfekcióhoz, de alkalmazása kedvező módon befolyásolhatja a transzfekciós gyakoriság értékét.

1.5. A transzfekciót követő fág szaporodás kinetikájának vizsgálata

Adataink megerősítésére és a transzfekciós módszerrel elért eredmények további bizonyítása céljából ellenőriztük, hogy a DNS felvételi lépést követő 30 perces 0 C° -os inkubáció illetve a korábbi 60 perces inkubáció alatt rendszerünkben nem történik fág szaporodás. A transzfekciós folyamat 90 percig tartó különböző lépései után a sejteket további 210 percig 5ml TA tápfolyadékban 34 C° -on rázattuk. 30 perces időközönként mintát vettünk és meghatároztuk e minták fágtiterét. Fágtermelődést csak a DNS-sel való inkubáció után tudtunk kimutatni. A hősokk utáni 120 perces időtartam után a fágtiter emelkedni kezd, majd 180 percnél éri el a fág kiszabadulásra /burst-ra/ jellemző értéket. /5.ábra/ A 0. percben / a hősokk után lehűtött, táptalajjal még nem vagy már higitott sejtszuszpenzióból/ vett minta szolgált kontrollként. További kontrollként ellenőriztük:

- hogy a DN-ázzal kezelt fág DNS-sel a transzfekciós gyakoriság értéke 0
- minden esetben meggyőződünk, hogy a fág DNS preparátumok





5. ábra Az ábra a transzekciót követő fágzaporodás folyamatát mutatja. A vízszintes tengelyen a hő sokkot követő táptalajban való inkubálás időtartamát, a függőleges tengelyen a plakkszámot tüntettük fel.

és az alkalmazott oldatok fágmentesek

- hasonlóan ellenőriztük minden transzfekeciós kísérlet kezdete előtt, hogy a használt baktériumtenyészetek fágmentesek
- a használt R.m.41-et más fágokkal megcseppentve ellenőriztük és minden esetben a baktériumtenyészeteket egy telepéből indítottuk.

A vad típusú, sok poliszaharidot termelő Rhizobium meliloti 41-el a fentiekben leirt körülmények között végzett transzfekeciós kísérletek negatív eredményt adtak. Az R. meliloti 41 másik általunk használt fágjának, a 16-3 fágnek tisztított DNS-ével is hasonló transzfekeciós kísérleteket végeztünk. A transzfekeciós gyakoriság értékek a stabil lizogén képző 16-3 fág DNS-sel egy nagyságrenddel elmaradtak a kontroll 11-es fággal kapott értékektől. A transzfekeció folyamatának összefoglalását a 6. ábra mutatja.

2. Rhizobium meliloti 41 transzformációja plazmid DNS-sel

A 11-es fág DNS-sel kidolgozott transzfekeciós módszert többféle plazmid DNS-sel is kipróbáltuk. Így E. coliból tisztított RP4 plazmid DNS-sel illetve pBR322 plazmiddal is megpróbáltuk a Rhizobium meliloti 41-et transzformálni. /Előkísérleteink idején még nem állt rendelkezésünkre adat arról, hogy a ColE1 replikonnal rendelkező plazmidok, mint a pBR322 is, képesek-e replikálódni R.meliloti 41-ben és csak később vált nyilvánvalóvá, hogy a pBR322 nem rep-

Rhizobium meliloti 41 transzfekeciója

Törzs: AK 631 kompakt R m 41

Elönövesztés: 0,3M szaharóz tartalmú komplett táptalajon
OD₅₄₀ 0,4-ig

↻ 4000rpm 20perc 0°C

↓
Mosás 100mM MgCl₂ 0°C

↻ 4000rpm 20perc 0°C

reszuszpendálás 150 mM CaCl₂ 1/20 tf.

↓ 30perc 0°C

↓ 0,2 ml baktérium sejt

+

↓ 0,1ml DNS (0,15M CaCl₂:SSC = 4:3)

↓ 60perc 0°C

↓ Hősokk 1,5perc 40°C

↓ 30perc 0°C

↓ Infektiv centrumok meghatározása

6.ábra A Rhizobium meliloti 41 11-es és 16-3 fág DNS-ével végzett transzfekeció lépéseinek összefoglalása

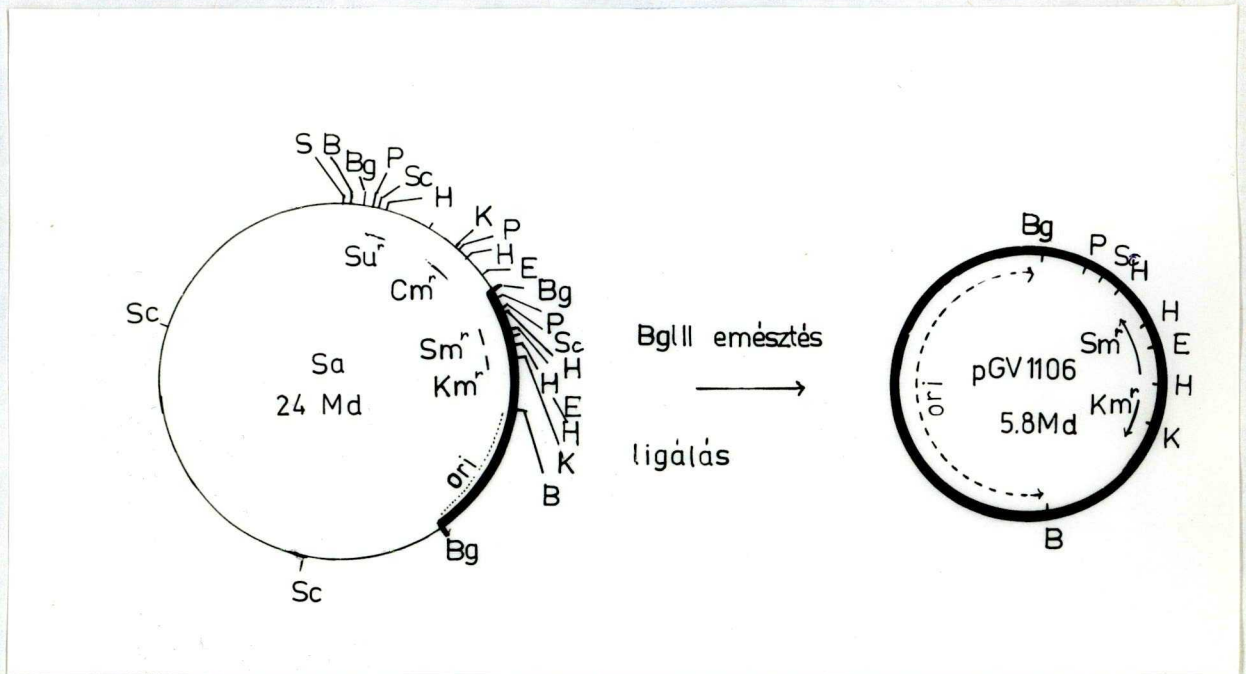
likálódik Rhizobiumban./ A transzformáció mindkét esetben negatív eredményt adott.

Mivel a Rhizobium meliloti 41-et az alkalmazott elő-növesztési körülmények és Mg^{2+} , Ca^{2+} kezeléssel alkalmassá tudtuk tenni 11-es fág DNS felvételére, feltételeztük, hogy az RP4 DNS-sel végzett transzformáció sikertelenségének oka 1/. Rhizobium meliloti 41-ben működő restriktív /modifikációs/ rendszer jelenléte és/vagy 2/. nem megfelelő méretű vagy tulajdonságú plazmid DNS alkalmazása lehet.

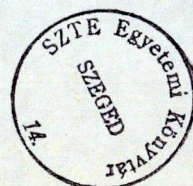
A feltételezett hibák kiküszöbölése céljából egy olyan plazmid DNS transzformációjával próbálkoztunk, melyet a széles gazdaspecifitású, W inkompatibilitási csoportba tartozó, több Gram negatív baktériumban replikálódni képes Sa-plazmidből állítottak elő./8/ Az Sa plazmid négyféle antibiotikum rezisztenciagént / kloramfenikol, szulfonamid, streptomycin/spektinomycin, kanamicin/gentamicin / hordoz és önálló konjugációra képes /tra⁺/. A Rhizobium melilotiba bevihető és fenntartható. /Kondorosi Á., szóbeli közlés/ Az Sa plazmid nagy mérete miatt vektorként való alkalmazása nehézkes, ezért egy deléciós származékát használják széles körben, melyet az Sa plazmid DNS BglII emésztésével és visszaligálásával állítottak elő./pGV1106 - 7.ábra./

A "mini-Sa" vagy pGV1106 plazmid csak a kanamicin és streptomycin rezisztencia géneket hordozza és önálló konjugációs transzferképességét elvesztette a BglII enzimmel készített deléció következményeként, hasonlóan a szulfonamid és kloramfenikol rezisztencia génekhez.

Kísérletünkben az E.coli C600 törzsből izolált pGV1106 DNS-t használtuk fel Rhizobium meliloti 41 transzformálásá-



7.ábra A pGV1106 készítése BglIII delécióval az Sa plazmidből. Az ábrán jelölt restriktációs endonukleáz hasítóhelyek rövidítései: Bg=BglIII, P=PstI, H=HindIII, E=EcoRI, Sc= SacII, S= SalI, K=KpnI, B=BamHI /8/



ra. A transzformációs kísérletek ismét negatív eredményt mutattak. Mivel a pGV1106 plazmidot vektorként széleskörűen alkalmazták a Rhizobium fajokkal rokon Agrobacterium tumefaciens esetében és ismertük, hogy a plazmid képes replikálódni Rhizobium meliloti 41-ben, ezért feltételeztük, hogy a transzformációval bejutó pGV1106 fentmaradását a Rhizobium meliloti 41-ben működő, eddig ismeretlen restriktív mechanizmus gátolja. A bejuttatott plazmid DNS-t következő kísérleteinkben két úton próbáltuk a sejt restriktív mechanizmusától megvédeni.

2.1. Transzformálás a pGV1106 vektor Rhizobium meliloti 41 11-es fág DNS fragmentjeit hordozó rekombináns plazmid származékaival

A pozitív transzfekciót mutató, R.meliloti 41-en szaporított 11-es fág DNS-ének elvileg védettnek kell lennie a Rhizobium feltételezett restriktív-modifikációs rendszerének restriktív endonukleázával szemben. Feltételeztük, hogy a pGV1106 11-es fág DNS-sel készített, ily módon hosszabb-rövidebb szakaszokon részlegesen védett, rekombináns plazmidszármazékainak a pGV1106 DNS-hez hasonlóan, fokozottabban védettnek kell lenniük a recipiens baktérium restriktív mechanizmusával szemben.

Rekombináns plazmidok elkészítéséhez a pGV1106 Sm^R génjében elhelyezkedő EcoRI hasítóhelyet választottuk, mivel a 11-es fág DNS-en csak tíz EcoRI hasítóhely van és ezáltal hosszabb 11-es fág DNS szakaszokat hordozó rekombinánsokat tudunk előállítani. Az EcoRI emésztett pGV1106 DNS-t ligálás előtt alkalikus foszfatázzal kezeltük, hogy

megakadályozzuk a vektormolekula önmagával való ligálódását. Az EcoRI emésztett pGV1106 és 11-es fág DNS-eket adott vektor-inszert kombinációkban T⁴ ligázzal ligáltuk, majd a ligálás eredményességét gélelektroforézissel ellenőriztük és a ligátumot a kidolgozott transzformációs módszer felhasználásával R. meliloti 41-be transzformáltuk. A klónozás sikerességének illetve a transzformáció hatásosságának ellenőrzésére a ligátum egy részét E.coliba transzformáltuk illetve 11-es fág DNS-sel kontroll Rhizobium transzfekeciót végeztünk. Hasonlóan a pGV1106 vektor esetében észleltekhöz a 11-es fág DNS fragmenteket hordozó rekombináns pGV1106 DNS-sel végzett transzformáció is negatív eredményt adott. Azaz a cirkuláris plazmid DNS egyes szakaszainak védettsége nem ad megfelelő védelmet a feltételezett restrikciós mechanizmussal szemben. A kontroll transzformálás és transzfekeció ezzel szemben pozitív eredményt szolgáltatott.

2.2. Transzformálás a Rhizobium meliloti 41-be juttatott és abból visszaizolált pGV1106 plazmiddal

A restrikciós endonukleázok okozta degradáció elkerülésére kidolgozott másik tervünk alapja annak a közismert ténynek a kihasználására épült, hogy az egymással nem rokon törzsek közötti konjugatív plazmid közvetítette plazmid transzferrel átvitt és bejutott plazmid DNS-ek fenttarthatók és kimutathatók a recipiens törzsbén, azaz kevésbé esnek áldozatul a sejt restrikciós endonukleázainak. Ezért a Rhizobium meliloti 41-be megpróbáltuk más konjugatív plazmid segítségével bejuttatni a pGV1106 plazmidot annak céljából, hogy

a következő lépésben, mostmár "R.m.41-szerint modifikált", Rhizobium meliloti 41-ből tisztított plazmid DNS-t használhassunk transzformációra.

2.3. A pGV1106 mobilizálása Rhizobium meliloti 41-be

A bevezetésben leírt konjugatív, Tc^R R68.45 plazmid egy kanamicin érzékeny származékát, a pJB3JI-et használtuk a pGV1106 plazmid mobilizálására, átvitelére Rhizobium meliloti 41-be. A pGV1106 plazmidot hordozó C600 E.coli törzsbe konjugáltattuk a pJB3JI-et az E.coli J53 törzsből. A Km, Tc, Sm tartalmú lemezekon szelektált transzkonjugánsok közül kiválasztott GY883 tartalmazta mind a pJB3JI, mind a pGV1106 plazmidokat, melyről a transzkonjugánsból izolált plazmid DNS-ek elektroforetikus analízisével meggyőződünk. /8. ábra 1,2,3/ A konjugációs gyakoriság értéke $= Tc^R Sm^R Km^R$ transzkonjugánsok száma / $Sm^R Km^R$ recipiensek száma / közel 1.0-nak adódott. A következő lépésben a fenti keresztezésből /1. II. Táblázat/ nyert E.coli C600 /pGV1106//pJB3JI/ = GY883 törzset használtuk donorként a R.meliloti 41 AK631 recipiensevel végzett keresztezésben. /2. II. Táblázat/ A keresztezés után Sm^R és Km^R illetve Tc^R prototróf recipiensekre szelektáltunk. A Tc^R , pJB3JI-et tartalmazó R.m.41 transzkonjugánsok 2.0×10^{-3} , míg a $Sm^R Km^R Tc^R$, pJB3JI-et és pGV1106 plazmidot tartalmazó transzkonjugánsok 3.8×10^{-7} gyakorisággal jelentek meg. A pJB3JI konjugációs illetve a pGV1106 mobilizációs gyakoriságának értékei között mutatózó 1.9×10^{-4} érték a pGV1106 és pJB3JI között létrejövő kointegrátképződés gyakoriságának értékét adja meg.

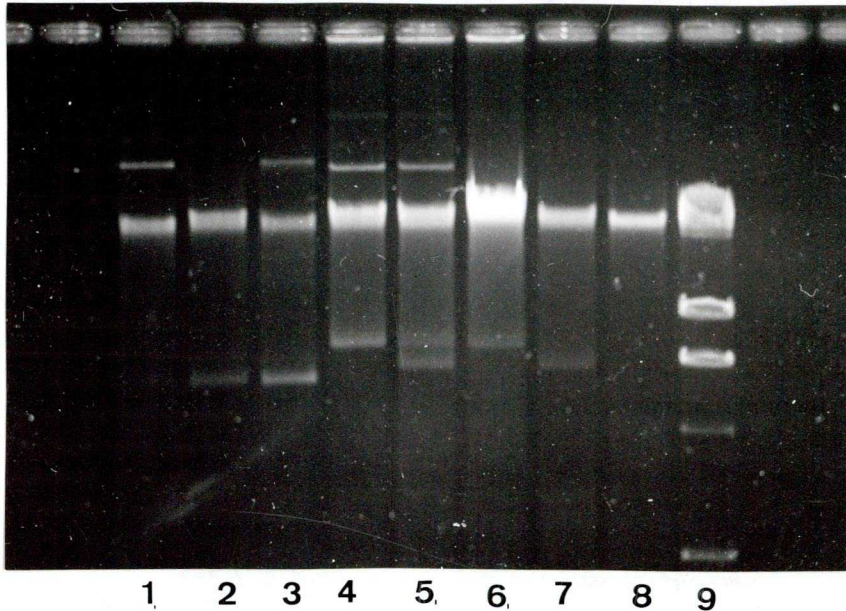
A keletkezett transzkonjugánsok közül néhányat megvizs-

II:TÁBLÁZAT

A pGV1106 és pKK2 plazmidok bejuttatása konjugációval R.m.41-be

Keresztezések	Donor	Recipiens	A donor	Szelektált	Konjugációs		Izolált
			markerei	marker	gyakoriság	gyakoriság	
					a/.	b/.	transzkonjugánsok
1	E.coli J53	E.coli C600	Tc ^R	Tc ^R	1.0	1.0	GY883
2	GY883	R.m.41 AK631	Tc ^R Km ^R Sm ^R	Tc ^R	2.0x10 ⁻³	1.0	-
				Km ^R Sm ^R	3.8x10 ⁻⁷	1.9x10 ⁻⁴	GY887, GY888
3	E.coli J53	GY940	Tc ^R	Tc ^R	1.0	1.0	GY942
4	GY942	R.m.41 AK631	Tc ^R Km ^R Sm ^R	Tc ^R	3.7x10 ⁻³	1.0	-
				Km ^R Sm ^R	2.1x10 ⁻⁶	5.6x10 ⁻⁴	-

A transzfer gyakoriságokat a recipiens sejtszámra ill. a pJB3JI transzkonjugánsok számára is megadtuk a pGV1106 /2/ és pKK2 /4/ pJB3JI plazmiddal végzett mobilizálása esetén. A GY940 törzs = JF1754 /pKK2/, a GY942 = JF1754/pJB3JI//pKK2/



8.ábra Az ábrán gyors plazmid izolálási módszerrel *E.coli*-ből és R.m.41-ből tisztított plazmid DNS-ek 0.7%-os gélen elektroforetikus futtatás utáni képei láthatók. A plazmidokat a következő törzsekből izoláltuk:

- 1/. *E.coli*J53 /pJB3JI/
- 2/. *E.coli* C600 /pGV1106/
- 3/. " GY883/pGV1106//pJB3JI/
- 4/. R.m.41 GY888/pJB3JI//pKK1/
- 5/. " GY887 /pJB3JI//pKK1//pKK2/
- 6/. " KK1/pKK1/
- 7/. " KK2/pKK2/
- 8/. " AK631
- 9/. HindIII emésztett λ CI857 DNS

gáltunk részletesebben. és jellemeztük tisztított plazmid DNS-eiket. A transzkonjugánsok mindegyike tartalmazta a Rhizobium meliloti 41 egyik, pRM41a és pJB3JI plazmidot. /A plazmidtisztítás használt módszerével nem mutatható ki a R.m.41 másik két, ún. megaplazmidja./ Meglepő volt, hogy a pJB3JI Rhizobiumban alacsonyabb mólsúlyú volt, mint E. coliban. /8.ábra 4,5/. A transzkonjugánsok legtöbbször tartalmazott még egy olyan plazmidot, amelynek valamivel magasabb volt a molekulásúlya, mint az E.coliból izolált pGV1106 plazmidé. /8.ábra 1,4//GY888 transzkonjugáns/ Egy különleges transzkonjugánsban /GY887/ két újonnan megjelent plazmid sávot észleltünk, mindkettőnek magasabb molekulásúlya volt, mint az agaróz gélen párhuzamosan elektroforetizált, E.coliból izolált pGV1106-nak. /8.ábra 1,2,5/ A legtöbb transzkonjugánsban és a GY887-ben jelenlévő magasabb molekulásúlyú plazmidot neveztük el pKK1-nek, míg a GY887-ben kimutatott kisebb méretű plazmidot pKK2-nek.

2.4. A Rhizobium meliloti 41 transzformációja pKK1 és pKK2 plazmid DNS-ekkel

Mivel a tesztelt transzkonjugánsokban található plazmid származékok közül a pKK2 plazmid volt a legkisebb méretű, ezért választottuk ki ezt, mint egy lehetséges, új Rhizobium meliloti 41-ben működő klónozó vektort transzformációs kísérleteinkhez. A pKK2 plazmid együtt volt jelen a GY887 törzsben a pKK1 és pJB3JI plazmidokkal. Ezért elsődleges feladatunk az volt, hogy előállítsunk egy olyan törzset, amely kizárólag a pKK2 plazmidot hordozza. A GY887 transzkonjugánsból plazmid DNS-t izoláltunk cézium klorid etidium

bromid sűrűségi egyensúlyi gradiens centrifugálással és a tisztított plazmid DNS-t /pKK1, pKK2 és pJB3JI keverékét/ használtuk fel a R.meliloti 41 transzformálásához.

A transzformáció körülményei azonosak voltak a 11-es fág DNS-re leírt transzfekeció optimális körülményeivel. A transzformációban 26 kanamicin és streptomycin rezisztens kolóniát kaptunk a szelektív lemezekon, mely rezisztencia-markerek a pGV1106 plazmidra jellemzőek. /III. Táblázat, 1.kísérlet/ A megjelnt transzformánsok közül 11-et vizsgáltunk plazmid DNS tartalomra illetve jelenlétre. A transzformánsok többsége egy, néhány a GY887-hez hasonlóan két plazmidot tartalmazott. További vizsgálatokra a pKK1-et tartalmazó KK1 és a pKK2-t hordozó KK2 törzset választottuk ki./8.ábra 6,7/

Az ezt követő transzformációs kísérletekben a KK2 törzsből tisztított pKK2 plazmidot használtuk. Egy ilyen transzformációs kísérletben átlagosan 10^2 nagyságrendben kaptunk streptomycin és kanamicin jelenlétében növekvő kolóniákat μg DNS-re vonatkoztatva. / A transzfekeció körülményei között 1 μg DNS a transzfekeció telítési tartományába eső DNS koncentrációt jelentett 300 μl térfogatban./ Azt, hogy a megjelenő $K_m^R S_m^R$ transzformánsok mind plazmid DNS felvétel következtében jöttek létre, a következő módon bizonyítottuk:

- 1/. Transzformálás előtt DN-ázzal kezelt pKK2 DNS-sel transzformálva nem kaptunk szelektív lemezen transzformáns kolóniát, míg sikeres transzformációt 9 független kísérletből 9 esetben tudtunk elérni, ha Rhizobium meliloti 41-ből tisztított pKK2 plazmidot használtunk.
- 2/. A kapott transzformáns kolóniákat fénymikroszkóppal,

morfológiailag nem lehetett elkülöníteni a vad típusú R.m. 41-től.

3/. GTA tápfolyadékban a transzformánsok a szülői törzsszel azonos sebességgel növekedtek.

4/. Minden transzformánst teszteltünk R.m.41 16-3 fág szenzitivitásra. A transzformánsok a szülői törzshöz hasonlóan 16-3 fág érzékenyek voltak.

5/. Elektroforézissel az R.m.41 plazmidjai, a pRm41a és pRm41b detektálhatóak voltak minden transzformánsban.

6/. A KK1 és KK2 törzseket megvizsgáltuk növényi tesztben, hogy képesek-e nodulációra és nitrogénkötésre. ugyanolyan effektivitással, mint a vad típusú Rhizobium meliloti 41. A KK1-el és KK2-vel fertőzött növényeken átlagosan ugyanannyi gumó volt, mint a vad törzsszel fertőzötteken és a növények habitusa is azonos volt. Megállapítható volt, hogy a vizsgált transzformánsok nod⁺ és fix⁺ fenotípusúak a szimbiotikus gazdanövény-baktérium kölcsönhatásban.

7/. A pKK2 plazmid elvesztése együtt járt a kanamicin és streptomycin rezisztencia elvesztésével. Ha a KK2 törzset nem szelektív táptalajon 10 generációig növesztettük, a kolóniák 13%-a spontán elvesztette kanamicin és streptomycin rezisztens fenotípusát. /pl.: 281 kolóniát véve 100%-nak a plazmid 36-ból szegregált/ Semmiféle pKK2-höz hasonló plazmidot nem tudtunk detektálni az ilyen kanamicin és streptomycin érzékeny szegregánsokban.

8/. A pKK2 plazmidot visszanyertük minden egyes plazmid-tartalomra tesztelt transzformánsból, összesen 42 vizsgált esetben.

Ha a transzformációt E.coli C600 törzsből izolált

III.TÁBLÁZAT

Rhizobium meliloti 41 transzformációja plazmid DNS-sel

Plazmid DNS	A plazmid DNS eredete	Km ^R és Sm ^R transzformán- sok száma / µg DNS	Transzformációs gyakoriság	Kezelés
1/. pKK1, pKK2	R.m.41 /GY887/	26	3.6 x 10 ⁻⁹	-
2/. pKK2 ^b	R.m.41 /KK2/	10-56	2.0-8.0 x 10 ⁻⁹	-
3/. pKK2 ^c	R.m.41 /KK2/	0	◀ 0.2-1.0 x 10 ⁻¹⁰	DN-áz ^a
4/. - ^{cd}	-	0	"	-
5/. pGV1106 ^c	E.coli C600	0	"	-
6/. pKK2 ^c	E.coli /GY940/	0	"	-

a A DN-áz kezelés körülményei: 10 µg/ml pKK2, 0.1 mg/ml DN-áz 50mM Tris.HCl /pH 7.4/, 5mM MgCl₂ oldatban. A b kísérleteknél a transzformációt 8, a c kísérleteknél 3 esetben ismételtük meg. A d kísérletekben a transzformáló elegyhez nem adtunk plazmid DNS-t.

pGV1106 vagy E.coliba transzformált, majd újra izolált pKK2 plazmiddal végeztük a szelektív lemezeken nem jelent meg transzformáns. /III.Táblázat/ Tehát a R.m.41-ből izolált plazmid alkalmazása a transzformáció sikerességének előfeltétele.

2.5. A pKK2 plazmid újboli bevitele konjugációval Rhizobium meliloti 41-be

A KK2 törzsből izolált pKK2 plazmidot 6×10^3 transzformáns / μ g DNS gyakorisággal tudtuk E.coli JF1754 törzsbe transzformálni. Egy kiválasztott transzformánsba /GY940/ konjugációval bejuttattuk a pJB3JI plazmidot./II.Táblázat, 3.kísérlet/ A kapott transzkonjugánsok közül egyet tisztítottunk /GY942/, amely mind a pKK2, mind a pJB3JI plazmidokat tartalmazta, majd vad típusú /AK631/ Rhizobium meliloti 41-el kereszteztük. / II. Táblázat, 4.keresztezés/ A kanamicin és streptomycin rezisztens transzkonjugánsok 2.1×10^{-6} transzkonjugáns/recipiens gyakorisággal jelentek meg. 12 transzkonjugánsból 11 tartalmazta az eredeti pKK2 plazmidot. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a pKK2 plazmid struktúrális változás nélkül bevihető R.meliloti 41-be nemcsak transzformációval hanem pJB3JI R68.45 származék közvetítette mobilizációval is.

2.6. A pKK2 plazmid kópiaszáma Rhizobium meliloti 41-ben

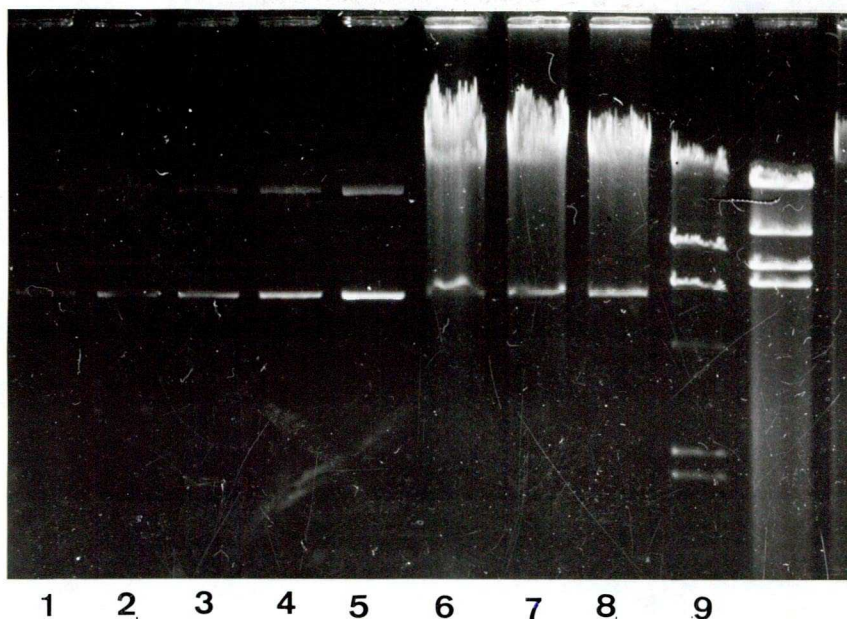
A 8.ábra gélképén látható GY887 és KK2 törzsekből tisztított plazmidok sávjainak UV fényben mutatott fluoreszcen-



cenciájának intenzitása jelzi, hogy sejtenként több, mint egy pGV1106 származék lehet jelen. /8.ábra 1,5,7/ Ezt a megállapításunkat a pKK2 R.m. 41-ben lévő minimális kópiaszámának becsléssel történő meghatározásával támasztottuk alá.

Három egymástól függetlenül indított KK2 kulturát OD₅₄₀:1.3 denzitásig növesztettünk és meghatároztuk az élősejtszámot: 1.5 ml tenyészetben 1.95×10^9 sejt volt. Ebből a sejtmennyiségből az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon plazmidot preparáltunk. A tisztítási folyamat végén az 1.5 ml tenyészetből nyert plazmid DNS-t 30 μ l desztillált vízben feloldottuk és ennek 1/6-od részét, azaz 5 μ l-t vittünk fel mindhárom mintából egy 0.7%-os agaróz géltre, ami 3.25×10^8 sejtből tisztított DNS-nek felel meg. Ugyanezen az agaróz gélen ismert, 0.0026, 0.052, 0.104, 0.208 és 0.416 μ g mennyiségű, előzőleg cézium klorid etidium bromid gradiensen tisztított pKK2 plazmidot is futtattunk. A gél fényképéről /9.ábra/ közelítőleg megbecsülhető, hogy az ismeretlen koncentrációjú, de ismert mennyiségű sejtből tisztított pKK2 DNS minimálisan 0.052 illetve 0.104 μ g mennyiségnek felelhet meg. A pKK2 plazmid molekulaszúlyából, ami 6.6 MD /megfelel 10.3 Kb méretnek/ és a Loschmidt konstans felhasználásával / 6.023×10^{23} / kiszámítottuk, hogy 0.052-0.104 μ g pKK2 plazmid DNS megfelel 4.5 - 9.45×10^9 pKK2 molekulának, tehát a 3.25×10^8 összsejtszámot figyelembe véve sejtenként minimum 14, de legfeljebb 29 pKK2 plazmid van Rhizobium meliloti 41 KK2 törzsében.

Ugyanezt az elméleti megfontolást használta Hansen és Olsen /102/ plazmidok kópiaszámának becslésére. Ez az eredmény összhangban van Falkow és mtsi-nak azzal a megállá-



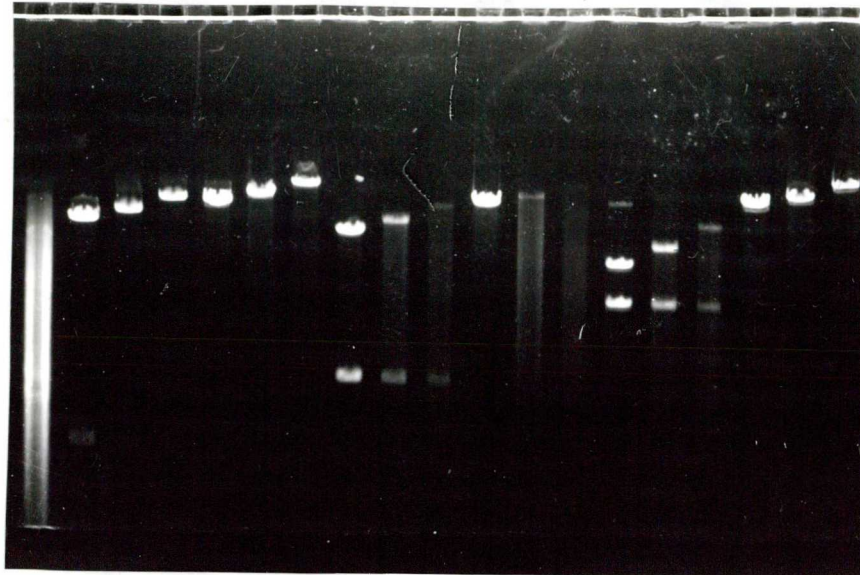
9.ábra A pKK2 plazmid kópiaszámának becsléssel történő meghatározása/102/ A pKK2 kópiaszámának becsléséhez 3×10^8 KK2 sejtnek megfelelő mennyiségű, gyors plazmidizolálási módszerrel tisztított, 0.7% agaróz gélben futtatott pKK2 plazmid mennyiségeket láthatunk a 6,7,8 mintán. Az 1-5 minták a tisztított, ismert koncentrációjú pKK2 DNS különböző /0.026, 0.052, 0.104, 0.208, 0.416 μg / mennyiségeit mutatják.

pitásával, hogy a W típusú plazmidok magasabb kópiaszám-
ban fordulnak elő a Gram negatív baktériumokban./94/

2.7. A pKK2 plazmid fizikai térképe

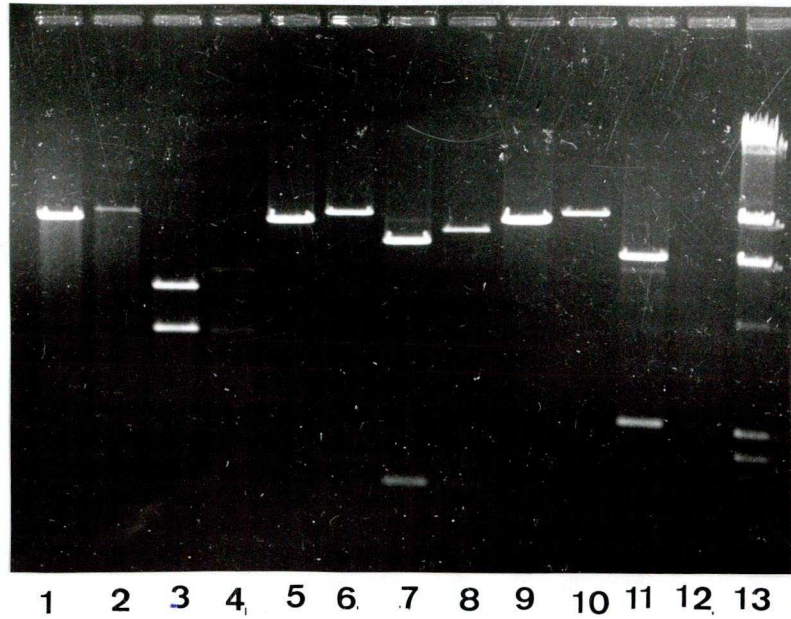
A pKK2 plazmid fizikai térképét a különböző restrikcí-
ós enzimekkel történő emésztések eredményeként létrejövő
DNS fragmentek mérete alapján szerkesztettük meg. A cézium
klorid grádiensen tisztított pKK2 plazmid egyes és kettős
emésztéseit az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt puffe-
rekben, megfelelő inkubációs hőmérsékleten végeztük a követ-
kező enzimekkel: BamHI, BamHI/BglIII, EcoRI, BglIII, BglIII/PstI,
PstI, BglIII/KpnI, KpnI és HindIII./10. ábra a,b,c,/

A felsorolt enzim kombinációkkal emésztett pKK2 plazmid
DNS mintákat HindIII-mal emésztett a CI 857 fág DNS marker-
rel párhuzamosan futtattuk 1%-os agaróz gélen. Az ismert
molekulasúlyú a DNS HindIII fragmentek mobilitása alapján
kalibrációs görbét készítettünk és ennek segítségével ha-
tároztuk meg az emésztett pKK2 plazmid DNS fragmentjeinek
méreteit. A pKK2 elkészített fizikai térképe bizonyította,
hogy a pKK2 egy, a plazmidba inszertálódott 1.3 Kb méretű
régióban különbözik a pGV1106 kinduló plazmidtól. A pKK2-
be integrálódott "idegen" DNS szakasz nem tartalmazott BglIII,
HindIII, EcoRI és BamHI hasítóhelyet, ellenben a pGV1106
fizikai térképéhez hasonlítva, a plazmidon megjelent egy
új KpnI és egy új PstI hasítóhely. A pKK2 0.8 Kb PstI
fragmentje, amely az újonnan beékelődött 1.36 Kb-os inszert-
ből ered együtt futott a gélen a pJB3JI 0.8 Kb-os PstI
fragmentjével. A pKK2 plazmid fizikai térképét a 11. ábra
mutatja.

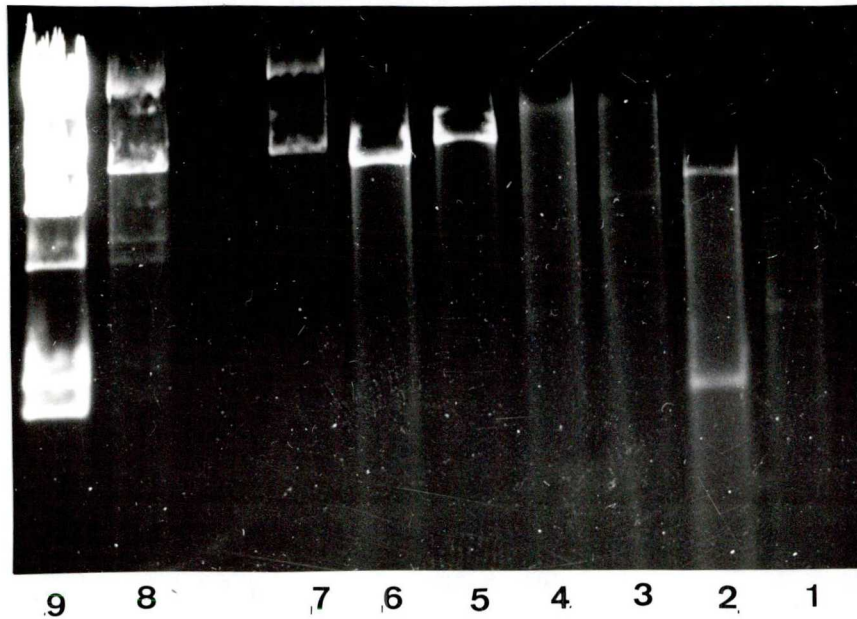


19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

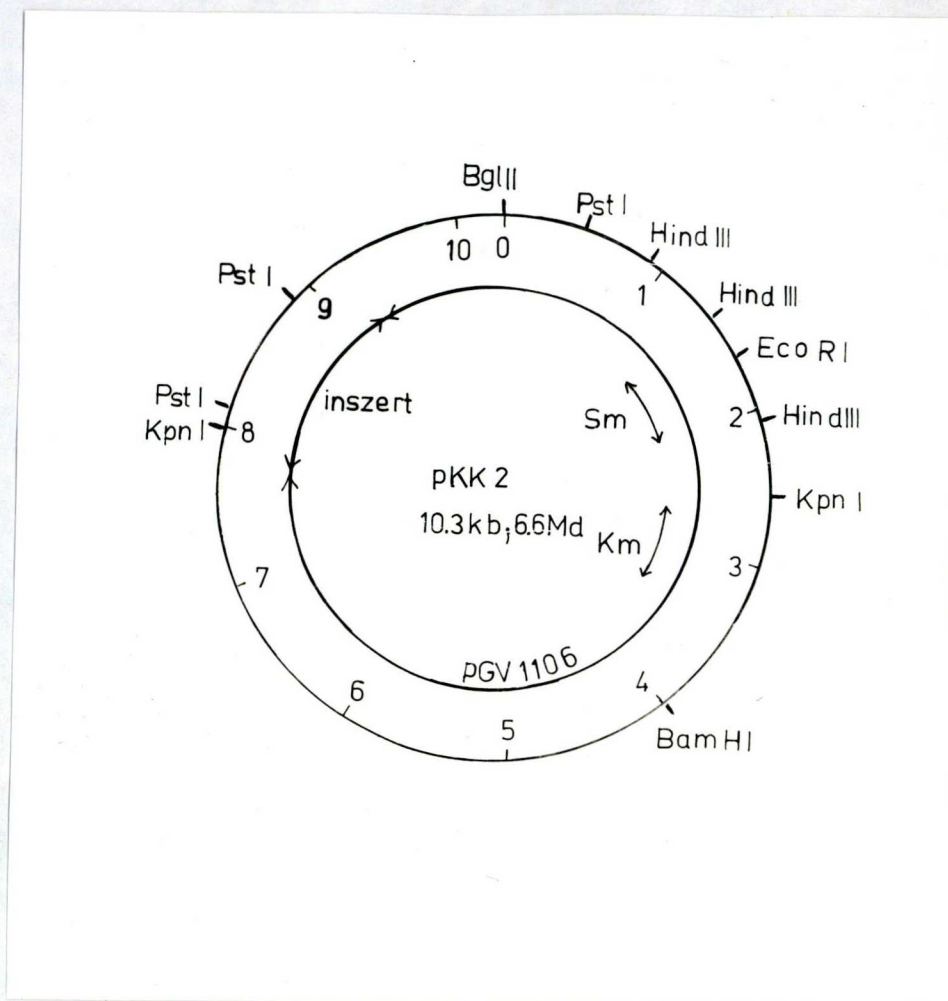
10.a ábra Restriktációs endonukleáz emésztések a pKK1, pKK2, pGV1106 térképezéséhez. A fényképen a pKK1, pKK2 és pGV1106 DNS-ek egyes vagy kettős emésztéseinek képeit láthatjuk a következő sorrendben: 1/. pKK1-BglIII, 2/. pKK2-BglIII, 3/. pGV1106-BglIII, 4/. pKK1-BglIII+BamHI, 5/. pKK2-BglIII+BamHI, 6/. pGV1106-BglIII+BamHI 7/. pKK1-BamHI 8/. pKK2-BamHI 9/. pGV1106-BamHI 10/. pKK1-BamHI+EcoRI 11/. pKK2-BamHI+EcoRI 12/. pGV1106-BamHI+EcoRI 13/. pKK1-EcoRI 14/. pKK2-EcoRI 15/. pGV1106-EcoRI 16/. pKK1 EcoRI+BglIII 17/. pKK2-EcoRI+BglIII 18/. pGV1106-EcoRI+BglIII 19/. λ DNS-HindIII



10.b ábra Restriktációs endonukleáz emésztések a pGV1106 és pKK2 restriktációs térképezéséhez. A minták sorrendje: 1/.pGV1106/BamHI, 2/. pKK2/BamHI, 3/. pGV1106/BamHI+BglIII 4/.pKK2/BamHI+BglIII 5/. pGV1106/BglIII, 6/. pKK2/BglIII 7/.pGV1106/EcoRI+BglIII 8/. pKK2/EcoRI+BglIII, 9/.pGV1106/EcoRI, 10/.pKK2/EcoRI, 11/.pGV1106/EcoRI+BamHI 12/. pKK2/EcoRI+BamHI 13/. λ DNS-HindIII



10.c ábra Restriktációs endonukleáz emésztések a pKK1 és pKK2 térképezéséhez A minták sorrendje:
 1/.pKK1 PstI, 2/.pKK2 PstI, 3/. E.coli J53-ból izolált DNS PstI, 4/.pJB3JI PstI, 5/.pKK1-HindIII
 6/. pKK2-HindIII, 7/.pKK1-KpnI, 8/.pKK2-KpnI
 9/. DNS-HindIII



11. ábra A pKK2 plazmid fizikai térképe

A fizikai térképet a szövegben felsorolt restriktív enzimekkel végzett egyes és kettős emésztések segítségével szerkesztettük meg. Nyilakkal jelöltük a kanamicin és streptomycin rezisztencia markerek helyét. A belső körön lévő nyilak a pKK2 plazmidba beépült inszert és a pGV1106 térképhelyzetét mutatják.



A pKK1 plazmid fizikai térképét szintén elkészítettük. Ez hasonló a pKK2 térképéhez, kivéve, hogy a pKK1 esetében a pGV1106 plazmidba épült inszert mérete 2.5 Kb nagyságú. Az inszert tartalmazta a jellemző 0.8 Kb méretű PstI fragmentet és KpnI hasítóhelyet is, de a pKK2 azonos fragmentjéhez hasonlítva a beépült idegen DNS szekvencia ellentétes orientációban helyezkedik el.

2.8. Előkísérletek a transzformációs gyakoriság növelésére

Mivel a transzformációs gyakoriság igen alacsony volt a pKK2 DNS-sel végzett első kísérletsorozatokban /pl.: 54 telep / μg DNS/, ezért ezt javítani próbáltuk az előtenyésztés körülményeinek módosításával Drozanska és Lorkievich-től kapott információk alapján.

Az AK631 R.m. 41 törzs éjszakán át növesztett tenyészetét 1:200-szorosra hígítottuk 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ glicint tartalmazó komplett táptalajban, majd 4 órán keresztül 34°C -on rázattuk. Az Anyagok és Módszerek fejezetben összefoglalt transzformációs módszert alkalmaztuk 1 μg DNS-t adva a sejtekhez. A transzformáció eredményeként átlagosan 500 transzformáns kolóniát számlálhattunk a szelektív lemezekon.

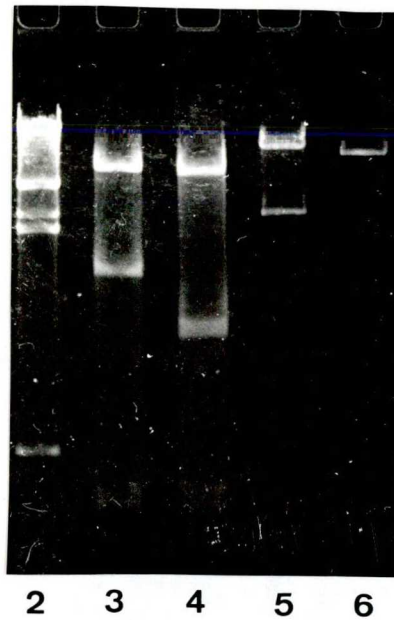
Párhuzamosan glicin mentes táptalajon is a fent leírtakkal egyidőben, azonos körülmények között növesztett és kezelt AK631 sejteket is transzformáltunk pKK2 DNS-sel. 100-150 $\text{Km}^{\text{R}} \text{Sm}^{\text{R}}$ transzformánst kaptunk átlagosan.

A sejtek glicines előnövesztésének eredményeként a transzformációs gyakoriság 3-4-szeresére emelhető.

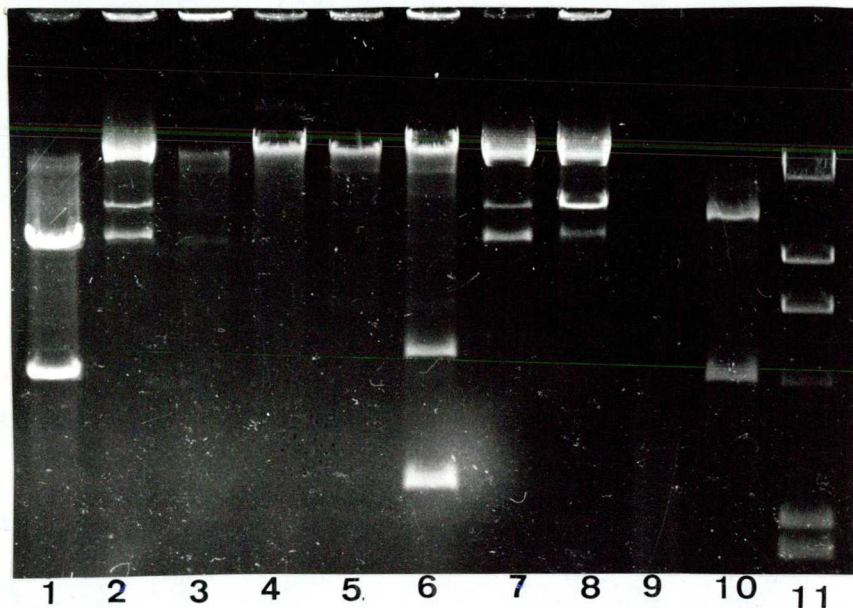
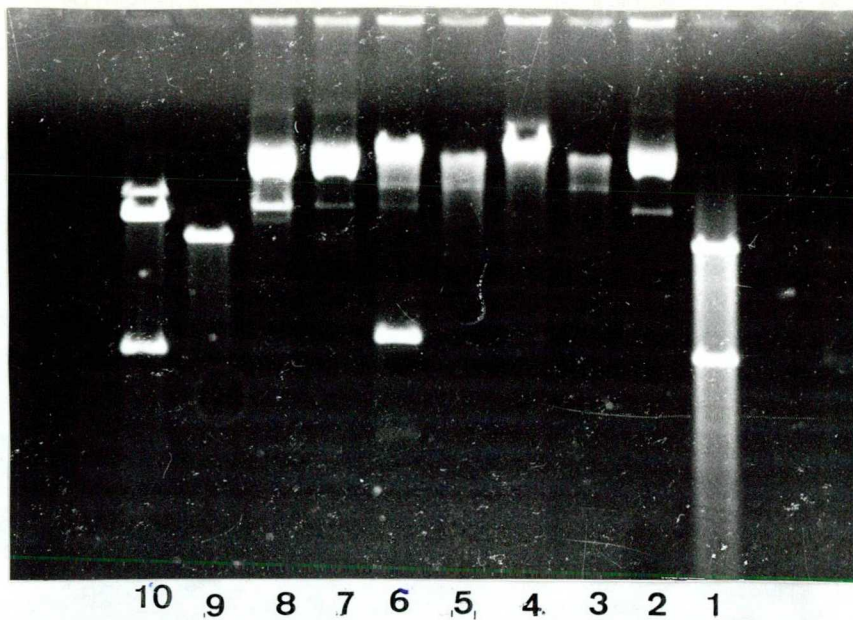
2.9. A Rhizobium meliloti nitrogénáz strukturgénjeit hordozó pRm41b plazmid 13 Kb méretű BamHI fragmentjének klónozása a pKK2 plazmidra

A pKK2 plazmid génebézészeti eljárásokban való alkalmazhatóságát egy 13 Kb méretű, biológiai funkciót hordozó DNS szakasz pKK2-be építésével igazoltuk.

Rendelkezésünkre állt egy olyan pBR322 rekombináns plazmid /p65/, amelynek BamHI helyére egy 13 Kb méretű BamHI fragmentet klónoztak, mely a Rhizobium meliloti 41 nitrogénáz strukturgénjeit tartalmazta. Ezt a p65 plazmidot megemésztettük BamHI enzimmel és hasonlóan a pKK2 plazmidot is, amely egyetlen BamHI restrikciós hasítóhelyet tartalmaz. A BamHI-el linearizált pKK2 és BamHI emésztett p65 DNS-t gélelektroforézissel megfuttattuk, hogy ellenőrizzük az emésztés teljességét./12.ábra/ Ezután a két emésztett DNS-t összeligáltuk, majd E.coli JF 1754 törzsbe transzformáltuk. Kanamicin rezisztens telepek megjelenésére szelektáltunk, mivel a pKK2 plazmid kanamicin, streptomycin, a pBR322 ampicillin és tetraciklin rezisztencia markereket hordoz. Összesen 288 kanamicin rezisztens telep jelent meg a transzformáció után a lemezeken. A következőkben ezek közül ki kellett szelektálni a kívánt 13 Kb BamHI fragmentet hordozó pKK2 plazmidot tartalmazó kolóniákat. Erre a célra a kolónia-hibridizációs technikát választottuk, amelynek részletes leírását az előzőekben megadtuk. A 288 telepet három darab agar lemezre helyezett steril nitrocellulóz filterre csikoztuk, majd a lemezeket 34 C°-on inkubáltuk a telepek megjelenéséig. A filtereken nőtt baktériumok DNS-ét denaturáltuk, majd a filtereket neutralizáltuk és a DNS-t 2 óra 80 C°-os



12.ábra A pKK2 és p65 plazmidok BamHI emésztése
A 13Kb nitrogenáz strukturgéneket hordozó
pBR322-t BamHI-el emésztettük /5.minta/ és
ugyanakkor BamHI-el linearizáltuk a pKK2 plazmi-
dot is./6/ Az ábra /2/ oszlopa λ DNS-HindIII és
a pKK1/3/ pKK2 plazmid DNS-ek PstI fragmentjeit
/4/ tartalmazza még.



13.ábra Az R.m.41 nitrogenáz struktúrgéneket tartalmazó 13 Kb BamHI fragment klónozása a pKK2 vektorba. A BamHI-el emésztett p65 és pKK2 plazmidot ligálás után *E.coli* JF1754 törzsbe transzformáltuk és a szelektív lemezeken felnőtt transzformánsok közül kolóniahibridizálással választottuk ki a 13 Kb BamHI fragmentet hordozó rekombináns plazmidot tartalmazó klónt. Az ábrán nyolc pozitív hibridizálást mutató kolóniából tisztított plazmid DNS BamHI emésztési képe látható/1-8/, BamHI emésztett kontroll pKK2 és p65 DNS-ek mellett 1.0% agaróz gélen. A /11/ sáv a DNS HindIII fragmenteket tartalmaz.

kezeléssel irreverzibilisen nitrocellulóz filterre kötöttük. Rendelkezésre állt az eredeti p65 plazmidból izolált BamHI fragment, melyet nick- transzlációval α - $/P^{32}/dATP$ -vel jelöltünk. A kezelt filtereket ezzel a próbával hibridizáltuk. 16 órás autoradiográfiás expozíció után a röntgenfilmeket előhívtuk és a pozitív hibridizálást mutató kolóniákat a kontroll lemezekon azonosítottuk. 8 pozitív hibridizálást adó kolóniából gyors plazmidizolálást végeztünk és a preparátumokat BamHI enzimmel emésztettük. Ennek eredménye a 13. ábrán látható.

A pKK2 plazmid tehát sikeresen alkalmazható relative nagy fragmentek klónozására is. A p65 plazmidból származó 13 Kb méretű nitrogenáz struktúrgént tartalmazó BamHI fragmentet be tudtuk építeni a pKK2 BamHI helyére. E fragment biológiai funkciójának tanulmányozását ineffektív Rhizobium meliloti mutáns törzsek komplementációjával az SZBK Rhizobium genetikai csoportjában végezték el.

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Kidolgoztunk a Rhizobium meliloti 41-re a 11-es fág DNS-sel egy közvetlen DNS felvételen alapuló transzfekeciós módszert. A Rhizobium meliloti 41-t 0.3M szaharózzal kiegészített komplett táptalajon történő előnövesztéssel és Mg^{2+} , Ca^{2+} kezeléssel tettük bizonyos mértékig kompetenssé.

Kísérleti eredményeink alapján megállapítottuk, hogy szaharóz kiegészítés nélkül a komplett táptalajon szaporított R.meliloti 41 sejteket transzformálva a transzfekeciós gyakoriság értéke a spontán értékre $/10^{-10}/$ csökken.

Méréseink szerint a Rhizobium meliloti kompetens állapota a logaritmikus fázis középső tartományában van $/6-8 \times 10^8$ sejt /ml/ szemben Balassa/77/, Zelazna /79/, Raina és Modi /93/ és Kondorosi /84/ eredményeivel, akik korai logaritmikus fázisú, $2-5 \times 10^7$ sejt /ml denzitású tenyészeteknél tapasztalták a DNS felvételére leginkább alkalmas állapot kialakulását.

Az Escherichia coli transzformációs rendszereknél - hasonlóan a mi mérési eredményeinkhez - a közép és késői logaritmikus fázisú tenyészetek a leginkább kompetensek.

Fontos körülmény a sejtek szinkron állapota, amit éjjelen át növesztett tenyészetek visszahigitása utáni 4-6 órás növesztés eredményez.

A transzfekeciós ráta kísérleti körülményeink között viszonylag alacsony volt $/10^3$ infektív centrum / μg 11-es fág DNS/, ami arra mutat, hogy a kompetencia állapot valóban optimális körülményeit nem sikerült megtalálnunk.

Azonban hasonlítva a *Rhizobium meliloti* 41-re korábban leírt transzfekeciós rendszerekben elért eredményekhez /84/ a transzfekeciós gyakoriságot több, mint tízszeresére sikerült emelnünk.

Rendszerünk előnye az, hogy a DNS felvételt a baktériummal, annak szferoplasztta való átalakítása nélkül sikerült elérni. Igazán jó transzfekeciós gyakoriság értékeket *Rhizobium meliloti* 41-ben eddig csak helper fágos transzfekeciós rendszerben sikerült /84/ elérni. Ennél a módszernél több szempontból is előnyösebb a kompetens sejtek DNS felvételén alapuló transzfekeciós rendszer használata:

- a helper fágos transzfekeciós rendszereknél zavarólag hat a helper fág jelenléte, így transzformációs kísérletek modellezésére nem használható
- a helper fágos transzfekeciós rendszer /és a szferoplasztos transzfekeciós rendszer is/ nem alkalmas a kompetencia és a DNS felvétel mechanizmusának vizsgálatára, mivel ezeknél a rendszereknél a nem kompetens sejtek is képesek a DNS felvételére.

Mikroszkópos ellenőrzéssel megállapítottuk, hogy a szaharózon növesztett sejtek gyökeres strukturális változást nem szenvednek, valószínűleg a membrán áteresztőképességét befolyásoltuk az ozmótikum használatával.

Az *E. coli*-nál alkalmazott Mg^{2+} - Ca^{2+} kezelés és hő sokk /67,76/ hatással van a szintén Gram negatív baktériumok csoportjához tartozó *Rhizobium meliloti* DNS felvevő képességére.

Méréseink szerint a hőkezelésre a *Rhizobium meliloti* 41 sejtek az *E. coli*tól eltérően reagálnak, alacsonyabb hőmér-

sékleten és rövidebb ideig alkalmazott hőkezelés esetén kaptunk kedvezőbb eredményt.

A transzfekeció tényét több adattal alátámasztottuk:

- DN-áz kezelt 11-es fág DNS preparátumokkal transzfekektálva nem keletkeztek infektív fágpartikulumok
- RN-ázos kezelés nem befolyásolta a transzfekeciót
- a kísérletekben használt oldatokban nem volt fág szennyezés. Bizonyítottuk azt is, hogy a kísérletekben a transzfekeciós kezelés alatt nem történik fág szaporodás, tehát az infektív centrumok számát mértük kísérleteinkben.

A transzfekecióhoz olyan kompakt szerkezetű Rhizobium meliloti 41 törzset használtunk, amelynek sejtfala kevesebb mukopoliszaharidot termel, de ilyen tulajdonságú települ bármely mutáns R.m.41 törzs szélesztése során izolálható. Ezt a telepmorfológiában jelentkező minőségi különbséget használta ki Balassa és Gábor /77/, akiknek "rúcskös szélű" Rhizobium lupini törzsszel sikerült először kromoszómális DNS-t transzformálni.

Transzfekeciós módszerünk minden kipróbált esetben reprodukálható volt szemben a korábban leközölt közvetlen DNS felvételen alapuló módszerekkel.

A transzfekeció viszonylag alacsony hatékonyságának oka a DNS felvételi nehézségeken / kistokú sejtfal permeabilitás, DNS köthelyek hiánya / kívül még a sejtbe bejutott DNS lebomlása is lehet. A fág DNS nagy molekulásúlya miatt eleve nehezen tud bejutni a sejtbe sérülés nélkül. A fág DNS tisztítása során bekövetkezett sérülések mértékétől is függ a transzfekeciós gyakoriság értékek reprodukálhatósága.

Munkánk kezdetekor még nem közöltek jól reprodukálható, plazmid DNS transzformálására is alkalmas transzfekeciós vagy transzformációs módszert *Rhizobiumra*.

A dolgozatban szereplő sikeres transzformációs kísérleteket egy konjugatív plazmidtranszferrel /mobilizációval/ *Rhizobium meliloti* 41-be juttatott, majd ebből a törzsből izolált plazmid DNS-sel végeztük.

Egy R68.45 származék segítségével elvégzett konjugációs lépéssel az Sa plazmid egy származékát, a pGV1106-ot mobilizáltuk R.m.41-be, majd az így készített R.m.41 törzsből készített pGV1106 plazmidszármazékok DNS-eit használtuk fel transzformációs kísérleteinkhez.

Ezzel a lépéssel tudtuk csökkenteni a R.m.41 baktérium sejtekben az idegen DNS-sel szemben fellépő restrikeciós mechanizmus degradatív hatását.

A *Rhizobium meliloti* 41-be mobilizált pGV1106 plazmid, így a KK2 transzkonjugánsból visszaizolált pKK2, egy 1.3 Kb méretű, a mobilizálás folyamata során a plazmidra épült DNS fragmentben különbözik a pGV1106 plazmidtól. A *Rhizobium meliloti* 41-ből izolált pKK2 plazmid DNS-sel sikeres transzformációt tudunk végrehajtani a transzfekecióra kidolgozott körülmények alkalmazásával. A transzformációs gyakoriság értéke alacsony / $0.5 - 2.0 \times 10^2$ transzformáns / μg plazmid DNS/ volt, de a transzformáció reprodukálható eredményeket adott. Kilenc egymástól függetlenül elvégzett kísérletben bizonyítottuk, hogy a megjelenő $\text{Km}^R \text{Sm}^R$ telepek a plazmid DNS kezelés eredményeként voltak izolálhatók. Erre közvetlen bizonyíték volt az is, hogy a transzformánsokból minden esetben változatlan formában vissza tudtuk nyerni a transzformációban használt pKK2 plazmid DNS-t.



A transzformációs gyakoriság alacsony értéke feltethetőleg nem a nem megfelelően megválasztott szelekciós körülményeknek tulajdonítható, mivel a lemezelési hatások /plating efficiencia/ meghatározása céljából végzett kontroll kísérletben az antibiotikum mentes lemezeken megjelenő telepszám 78%-át kaptuk szelektív /Km, Sm - tartalmú/ szelektív lemezeken. Ez azt jelzi, hogy a sejtek kompetencia állapota illetve a transzformációs gyakoriság értéke a körülmények változtatásával feltehetően tovább fokozható. Ezt a megállapítást erősíti meg a glicinnel kiegészített komplett táptalajon előnövesztett sejtekkel végzett transzformációs előkísérletek eredménye, melyben a transzformációs gyakoriság értékét $0.5 - 1.0 \times 10^3$ transzformáns / μg DNS értékre tudtuk emelni.

Rhizobium meliloti 41-ben az általunk feltételezett restriktív-modifikációs rendszer létezését látszik alátámasztani az a tény, hogy sem E.coliból izolált pGV1106, sem pKK2 plazmid DNS-ekkel végzett transzformációban, a fent említett körülmények között, nem kaptunk transzformánst. Ismert, hogy fágfertőzés esetében a recipiens sejt működő restriktív mechanizmusa a fágok relatív lemezelési hatását a restriktív deficiens törzsekhez képest átlagosan 10^{-6} - 10^{-8} -ad részére csökkenti. A restriktív modifikációs rendszer létezésére, a transzformáció indirekt módon bizonyításra felhasználható negatív eredményei mellett, közvetlen bizonyítékot nem tudtunk találni eddig, mivel nem ismert olyan másik Rhizobium meliloti 41 törzs jelenleg, amelyen a használt törzsünkön szaporított 11-es vagy 16-3 fágok eltérő, csökkent lemezelési hatások /relatív plating

efficiencia/ értéket adnának, vagy fordítva, az ezen a törzsön szaporított fágok lemezelési hatásfokának értéke drasztikusan csökkenne az általunk használt R.m.41 törzs esetében. A Rhizobium meliloti 41 restriktív modifikációs rendszerének jellemzéséhez a jövőben alternatív megoldásként szükséges lenne un. hsrR, restriktív minusz mutáns előállítása.

Megállapításainkkal ellentétes eredményről számolt be kísérleteinkkel egyidőben Selvaraj és Iyer /96/, akik egy más Rhizobium meliloti esetében lefagyasztás-felolvasztás technikával végeztek transzformációt tetraciklin és kanamicin rezisztencia markeret hordozó, különböző méretű /9.6-56 Kb/ RK2 plazmid származékokkal, melyeket E. coliból izoláltak. Az általuk elért átlagos transzformációs gyakoriság értéke /0.07 - 3.7 x 10³/ attól függően változott, hogy milyen Rhizobium meliloti törzset használtak. Az olvasztás időtartama alatt különböző időkben adott plazmid DNS-sel mért transzformációs gyakoriság adatokat két elképzelés merült fel a transzformáció mechanizmusának magyarázatára:

- a plazmid DNS felvétele egy átmeneti időszakban, mikor a sejtek már nincsenek kitéve a fagyási hőmérsékletnek, a membránváltozások, tranzíciók következtében valószínű megkönnyített,
- a fagyasztás-olvasztási lépés átmeneti védekezést nyújthat a sejtbe belépő plazmid DNS-nek a sejtfelszínen, periplazmatikus térben jelen lévő nukleázoktól.

A Rhizobium meliloti-val szemben O'Gara és Dunican /95/ a Rhizobium trifolii esetében magas transzformációs gyakoriságot értek el plazmid mediált transzformációban. Hasonlóan, munkánk befejezése után, Rhizobium leguminosarum-

Bullerjahn és mtsi./100/ sikeres transzformációs módszert dolgoztak ki. A fagyasztás-olvasztásos módszert használták, a fagyasztás lépését CaCl_2 és EDTA jelenlétében végezve. E módosítással sikerült Rhizobium leguminosarumból izolált R68.45 plazmiddal igen alacsony gyakoriságú / 5×10^{-8} transzformáns / $\mu\text{g DNS}$ / transzformációt kapniuk. Hasonlóan az általunk Rhizobium meliloti 41-nél észlelt jelenséghez, E.coliból tisztított R68.45 plazmid DNS-sel nem kaptak transzformánsokat.

Esetünkben feltehetően a kompetenssé tett sejtek száma alapvetően befolyásolja a transzfekeciós és transzformációs gyakoriság értékét. Erre utal a transzfekeciós gyakoriság és alkalmazott DNS mennyiség közötti telítési görbét mutató összefüggés illetve a transzformációs gyakoriság és a tenyészetek előkezelése között tapasztalt szoros korreláció.

A pGV1106-tal végzett sikertelen transzformáció elvileg magyarázható lenne a pKK2-ben jelenlevő extra DNS szakasz hiányával is a pGV1106 esetében. Az E.coliból izolált pKK2 plazmid DNS-sel végzett kontroll transzformációs kísérletek negatív eredménye azonban egyértelműen kizárja e feltételezés helyességét.

A pKK2-ben megjelenő 1.3 Kb inszerció eredetére egyértelmű magyarázatot találhatunk, ha részleteiben áttekintjük az R68.45 származékokkal végzett plazmid mobilizáció mechanizmusát. Esetünkben a pGV1106 Sa-plazmid származékot az R68.45 ampicillin és kanamicin szenzitív variánsával, a pJB3JI plazmiddal mobilizáltuk E.coli-ból R.meliloti 41-be. A pJB3JI az R68.45-höz hasonlóan az R68 plazmid egy

olyan stabil mutáns, mely az R68 plazmidhoz hasonlítva fokozott kromoszóma, plazmid mobilizációra képes. A kifejezettebb Cma⁺ jelleg összefüggésbe hozható azzal, hogy szemben az R68-al, ahol a plazmidon egyetlen IS8 /alternatív nevén IS21/ inszerciós szekvencia van jelen, az R68.45 és származékai az IS8 két, azonos orientációban ismétlődő kópiáját tartalmazzák./8,9/ Az R68.45 plazmid közvetítette mobilizációs folyamat molekuláris mechanizmusát vizsgálva Reiss és mtsi./99/ a közelmúltban kimutatták, hogy az R68.45 plazmid által mobilizált plazmidok az R68.45 két ismétlődő IS8 kópiája közé épülnek, azaz a két plazmid között a mobilizáció során képződő kointegrátban a mobilizált plazmidot két azonos orientációban ismétlődő IS8 kópia fogja közre. A kointegrát szerkezet kialakulását megelőző lépésben az IS8, replikációja során véletlenszerűen átugrik, transzponálódik a mobilizált plazmid valamely régiójába. Az IS8 transzpozíciója *recA* mutáns sejtekben is megtörténik, azaz *recA* független. Esetünkben az IS8 a pGV1106 ismert genetikai markereket nem tartalmazó régiójába, a BamHI helytől közvetlen balra elhelyezkedő replikációs origótól balra eső plazmid régióba integrálódott. Azt, hogy valóban az IS8 integrációja történt meg a pGV1106 pJB3JI-el végzett mobilizációja során kísérleteinkből, a pKK2 elkészített fizikai térképe alapján könnyen megállapítható, mivel a pKK2 DNS-ben kimutatható az IS8-ra jellemző 0.8 Kb PstI fragment jelenléte, mely hasonlóan kimutatható a PstI emésztett pJB3JI DNS-ben is. A pKK1-ben is jelen van az IS8 szekvencia, azonban jelenleg nem világos, hogy a pKK2-től eltérő 2.5 Kb méretű inszert az IS8 egyetlen, vagy az R68.54-ben megtalál-

ható, részlegesen átfedő, kettős kópiáját hordozza a pKK2-höz hasonló régióba integrálódott 2.5 Kb DNS szekvencia. A mobilizálás során az IS8-at hordozó pGV1106 származékok és a pJB3JI között $recA^+$ E.coliban, az IS8 szekvenciák között bekövetkező homológ rekombinációval kialakul az előzőekben említett kointegrát struktúra. Az IS8 transzpozíciójának gyakorisága feltehetően igen magas, mivel az egyszeres cross-over gyakoriság értéke E.coliban és R.m.41-ben is kb. 10^{-3} , ugyanakkor a pGV1106 mobilizációs gyakoriság R.m41-be 3.8×10^{-7} -nek, míg a pJB3JI konjugációs transzferének gyakorisága 2.0×10^{-3} -nak adódott, melyekből következtethető, hogy az IS8 transzpozíciója a pGV1106 W-típusú plazmidra minden tizedik sejtben megtörténik. Ellentétben a Reiss és mtsi. által leírt eredményekkel esetünkben azt tapasztaltuk, hogy az IS8 integrációja a pKK1 és pKK2 esetében eltérő orientációban történt meg, következésképpen az integráció nem orientáció specifikus. Mivel a mobilizált plazmidok többségében az IS8 a pGV1106 plazmid azonos régiójába integrálódott, feltehető, hogy az integráció esetünkben bizonyos mértékig szekvenciaspecifikus./Mivel Km^R , Sm^R transzkonjugánsokat szelektáltunk, így az integráció helyére is szelektáltunk egyben, mert a replikációs origó régiójába illetve az antibiotikum rezisztenciagénekbe épült IS8 kópiát hordozó plazmidok ellen szelektáltunk./ A pJB3JI és pGV1106 között létrejövő kointegrátok Rhizobium meliloti 41-be jutva disszociálnak, mivel az R.m.41 $recA^+$ és mindkét plazmid képes független replikációra R.m.41-ben.

A pKK2 plazmid Rhizobium melilotiban észlelt bizonyos fokú instabilitása elvileg magyarázható a replikációs

origó közelébe épült IS8 kópia poláris hatásával. Azonban ismert, hogy az Sa plazmid deléciós változatai, így a pGV1106 plazmid is feltehetőleg nem hordozzák a plazmid utódsejtekben való stabil szegregációjáért felelős un. par /partitioning/ régiót ezért a pGV1106 származékok nagyméretű rekombinánsai még szelektív körülmények között is erős szegregációt mutatnak. A pGV1106 plazmid méretének növekedésével a kópiaszám csökkenését mutatták ki *Agrobacterium tumefaciens*ben. /Koncz Cs. szóbeli közlés/ Feltehetően a pKK2 észlelt instabilitása R.m.41-ben a pGV1106 említett tulajdonságaira vezethető vissza.

Érdekes megjegyezni, hogy a transzkonjugánsokban a pJB3JI méretének csökkenését tapasztaltuk. Ezt a jelenséget Riess és mtsi./99/ eredményei alapján magyarázni tudjuk. Az R68.45 plazmidban ugyanis a kointegrát szerkezet disszociálása után csak egy IS8 jelenléte volt kimutatható, azaz az R68.45 a mobilizációs folyamat eredményeként visszaalakul R 68 plazmiddá, mely elveszti így az R68.45 fokozott Cma⁺ jellegét.

A pKK2 plazmid, mivel az R68.45 származékokkal az IS8 régiókban bekövetkező homológ rekombinációval nagy gyakorisággal mobilizálható *Rhizobium*ba és e folyamat újabb változást nem eredményez a pKK2 vektorban /sem a vektorra épített fragmentekben/ használható, mint széles gazdaspecifitású klónozó vektor, így alkalmazható például a *Rhizobium meliloti* 41 szimbiotikus nitrogénfixálási génjeinek tanulmányozására. A leírt transzformációs módszer lehetővé teszi a pKK2 /R.m.41-ből izolált/ vektorra klónozott *Rhizobium meliloti* 41 fragmentek azonnali átvitelét a

ligálást követően R.m.41 kompetens sejtekbe, mivel az így elkészített rekombináns DNS molekulák továbbra is védettek a R.m.41 feltételezett restriktív rendszerével szemben.

Mintegy alternatív úton, a rekombinánsok elkészíthetők *E. coliban*, majd jellemzésük, *in vitro* mutagenézisük után a pJB3JI származékhoz hasonló R68.45 eredetű plazmidokkal nagy gyakorisággal mobilizálhatók *Rhizobium meliloti* 41-be.

A pKK2, mint vektor megtartotta a pGV1106 replikatív tulajdonságait, azaz egy közepes kópiaszámú plazmid, mint azt a kópiaszám becslése során megállapítottuk. A pKK2 egyetlen BglIII, BamHI, SacII és EcoRI hellyel, valamint három, egymáshoz közeli HindIII hasítóhellyel rendelkezik. Az EcoRI és HindIII enzimek a Sm^R / Sp^R gént inaktiválják, míg a BamHI és BglIII helyek további antibiotikum rezisztenciagének / $pl.: Cm^R$ gén/ beépítését is lehetővé teszik. A rekombináns plazmidok EcoRI és HindIII enzimekkel történő klónozás esetén a Sm^S fenotípus alapján könnyen szelektálhatók, a Km^R gén jelenléte követhető a transzformációban. A Km^R spontán R.m.41 mutánsok kizárását könnyen megoldja az a lehetőség, hogy a transzformánsok Gm^R és amikacin rezisztens fenotípusúak, mivel a pGV1106 Km^R gén terméke az aminociklitol-acetil-transzferáz /6'/ enzim inaktiválja a gentamicint, amikacint is. Következésképpen a transzformánsok Km és Gm együttes jelenlétében biztonsággal szelektálhatók. A plazmid viszonylag kis mérete nagyobb fragmentek klónozását is lehetővé teszi, a kb. 25Kb mérethatárig, mely után a pGV1106 stabilitása drasztikusan csökken. Ennek lehetőségét a *Rhizobium meliloti* pRm41b plazmidján kódolt

nitrogenáz struktúrgéneket hordozó 13Kb BamHI fragment
pKK2 vektoron való klónozásával bizonyítottuk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Disszertációm a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Genetikai Intézetében készítettem Dr.Kiss György Botond és Dr. Sik Tibor szakmai irányítása mellett. Mindkettőjüknek köszönöm, hogy munkámat lehetővé tették és elméleti, gyakorlati tanácsaikkal a kísérletek elvégzését segítették. Külön köszönettel tartozom Dr. Koncz Csabának, aki folytonosan figyelemmel kísérte munkámat, tanácsaival és a dolgozat gyakorlati megvalósításában is segített. Köszönet illeti Dr.Kondorosi Ádámot és a Rhizobium kutatócsoport többi tagját hasznos tanácsaikért, valamint Dr. Hadlaczký Gyulát a disszertáció képanyagának elkészítéséért.

IRODALOM

1. Sváb, Z.; Kondorosi, A.; Orosz, L. J. *Gen. Microbiol.* 106 321-327 /1978/
2. T. Sik, J. Horváth, S. Chatterjee *MGG* 178 511-516 /1980/
3. Bukhari, Shapiro *Plasmids, episomes and insertion elements*
Cold Spring Harbor Laboratory /1978/
4. Miller *Experiments in molecular genetics*
Cold Spring Harbor Laboratory /1972/
5. Haas, D., Holloway, B. W. *MGG* 144 243-251 /1976/
6. Thomas *Plasmid* 5 10-19 /1981/
7. Kondorosi, A., Kiss, G. B., Forrai, T., Vincze, E., Z. Bánfalvi
Nature 268 525-527 /1977/
8. Leemans, J. /1980/ *Gene* 10 319-328
9. Depicker, A. /1980/ *Gene* 10 329-338
10. Griffith, F. *J. Hyg.* 27 113-159 /1928/
11. Dawson, M. H. *J. Exp. Med.* 51 123-147 /1930/
12. Avery, O. T., Macleod, C. M., McCarthy *J. Exp. Med.* 79 137-158
/1944/
13. Tomasz, A., Hotchkiss, R. D., *P. N. A. S. USA* 51 480-487
/1964/
14. Pakula, R., Walczak, W., *J. Gen. Microbiol.* 31 126-133
/1963/
15. Kohoutová, M., Malek, I., *The Physiology of Gene and Mutation*
Expression ed. Kohoutová, M., Hubacek, J., pp. 195-200
Prague Academia /1966/
16. Leonard, C. G., Cole, R. M., *J. Bacteriol.* 110 272-280 /1972/

17. Lacks S.A., Microbial Interactions, Receptors and Recognition ed. J.L.Reissig pp. 179-232 London Chapman and Hall /1977/
18. Fox, M.S., Hotchkiss, R.D., Nature 179 1322-25 /1957/
19. Lacks, S., Greenberg, B., J. Mol. Biol. 101 255-75 /1976/
20. Lacks, S., J. Bacteriol. 138 404-409 /1979/
21. Lermann, L.S., Tolmach, L.J., Biochim. Biophys. Acta 26 68-82 /1957/
22. Tomasz, A., Bacterial Transformation ed. L.J.Archer pp.81-88 New York Academic /1973/
23. Horne, D., Plotchs, S., Tomasz, A., Modern Trends in Bacterial Transformation and Transfection ed. Portoles, R., Lopez, M., Espinosa pp.35-44 /1977/
24. Lacks, S., J.Mol. Biol. 5 119-31 /1962/
25. Morrison, D., Guild, W.R., J. Bacteriol. 112 1157-68 /1962/
26. Raina, J.L., Ravin, A.W., P.N.A.S. /1981/
27. Morrison, D.A., Mannarelli, B. J. Bacteriol. 140 655-65 /1979/
28. Vermeulan, C.A., Venema, G., J. Bacteriol. 118 334-341 /1974 a /
29. Vermeulan, C.A., Venema, G. J. Bacteriol. 118 342-350 /1974 b /
30. Dubnau, D., Cirigliapo J. Bacteriol. 111 488-94 /1972/
31. Gurney, T., Fox, M.S., J. Mol. Biol. 32 83-100 /1968/
32. Buitenwerf, J., Venema, G., M.G.G. 156 145-55 /1977/
33. Seto, H., Tomasz, A. P.N.A.S. USA 74 296-99 /1977/
34. Buitenwerf, J., Venema, G., M.G.G. 160 67-75 /1978/
35. Cozzarelli, N.R., Science 207 953-60 /1980/

36. Shibata, T., Cunningham, R.P., Das-Gupta, C., Radding, C.M.
P.N.A.S. USA 76 5100-4 /1979/
37. Davidoff-Abelson, R., Dubnau, D., J. Bacteriol. 116
146-53 /1973/
38. Lacks, S., Greenberg, B., Carlson, K., J. Mol. Biol. 29 327-47
/1967/
39. Ephrussi-Taylor, H., Sicard, A.M., Kaman, R., Genetics 51
455-75 /1965/
40. Lacks, S. Genetics 53 207-35 /1966/
41. Claverys, J.P., Roger, M., Sicard, A., M.G.G. 178 191-201
/1980/
42. Meselson, M., Pukkila, M., Wagner, R., Hermann, G., Modrich, P.
J. Supramol. Struct. Suppl. 4 p.311 /1980/
43. Leidy, G., Jaffee, J., Alexander, H.E., Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. 111 725-31 /1962/
44. Spencer, H.T., Herriott, R.M., J. Bacteriol. 90 911-20
/1965/
45. Herriott, R.M., Meyer, E.M., J. Bacteriol. 101 517-24 /1970/
46. Schaeffer, P., Edgar, R.S., Rolfe, R., C. R. Soc. Biol. 154
1978-83 /1960/
47. Scocca, J.J., Poland, R.L., Zoon, K.L., J. Bacteriol. 118
369-73 /1974/
48. Jyssum, S., Jyssum, K. Acta Pathol. Microbiol. Scand.
sect.B. 78 140-48 /1970/
49. Jyssum, K., Jyssum, S., Gunderser, W.B., Acta Pathol. Mic-
robiol. Scand. Sect.B. 79 563-71 /1971/
50. Dougherty, T.J., Asmus, A., Tomasz, A., Biochem. Biophys.
Res. Comm. 86 97-k04 /1979/
51. Sisco, K.L., Smith, H.O. P.N.A.S. USA 76 972-76 /1979/
52. Danner, D.V., Deich, R.A. Sisco, K.L., Smith, H.O., Gene
11 311-18 /1980/

53. Sutrina, S.L., Scocca, I.I. J. Bacteriol. 139 1021-27 /1979/
54. Voll, M.J., Goodgal, S.H. P.N.A.S. 47 505-12 /1961/
55. Notani, N., Goodgal, S.H., J. Gen. Physiol. 49 197-209 /1966/
56. Földes, J., Trautner, T.A., Z. Vererbungs1. 95 57-65 /1964/
57. Romig, W.R., Virology 16 452-459 /1962/
58. Reilly, B.E., Spizizen, J., J. Bacteriol. 89 78-79 /1965/
59. Guthrie, G.D., Sinsheimer, R.L., J. Mol. Biol. 2 297-305 /1960/
60. Harm, W., Rupert, C.S., Z. Vererbungs1, 94 336-348 /1963/
61. Okubo, S., Romig, W.R., J. Mol. Biol. 14 130-142 /1965/
62. Green, D.M., J. Mol. Biol. 10 438-451 /1964/
63. Green, G.M., J. Mol. Biol. 22 1-13 /1966/
64. Roberts / CRC Critical Reviews in Biochem. p.123 /1976/
65. Canosi, U., Morelli, G., Trautner, T.A., M.G.G. 166 259-67 /1978/
66. Bendler, J.W., J. Bacteriol. 125 197-204 /1976/
67. Mandel, H., A, Higa, J. Mol. Biol. 53 159-162 /1970/
68. Taketo, A., Kuno, S., J. Biochem. 75 895-904 /1974/
69. Bergmans, H.E.N. van Die, I.M., Hockstraw P.M., J. Bacteriol. 146 564-570 /1981/
70. Lederberg, E.M., Cohen, S.N., J. Bacteriol. 119 1072-1074 /1974/
71. Norgard, M.V., Keem, Monahan J.J., Gene 3 279-292 /1978/
72. Kuser In. Genetic Engineering, /Boyer, H.B. Nicosia eds./ pp.17-23, Elsevier Amsterdam /1978/
73. Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166 557-580 /1983/
74. Dityatkin, S.Y., Lisovskaya, K.V., Panzhava, N.N., Ilyashenko B.N., Biochim. Biophys Acta 281 319-23 /1972/

75. Holsters, M., de Wade, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., Schell, J., M.G.G. 163 181-87 /1978/
76. Chang, S., Cohen, S.N., M.G.G. 168 111-15 /1979/
- 77./a Balassa, G., A review of the work of R. Balassa
Bacteriol. Rev. 27 228-241 /1963/
/b Balassa, R., Gábor, M., Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.
11 329-339 /1964/
78. Gábor-Hotchkiss, M., Uptake of informative molecules by living cells; ed. L. Ledoux, North Holland Publishing Company Amsterdam pp.212-241 /1972/
79. Zelazna, I., Acta Microbiol. Pol. 13 291-298 /1964/
80. Drozanska, D., Z. Lorkiewich Acta. Microbiol. Pol. 27
81-83 /1973/
81. Staniewsky, R., Lorkiewich, Z., Chomicka, Z., Acta Microbiol. Polon. Ser. A. 3 97-100 /1966/
82. Sik, T., Orosz, L., Plant and Soil Special Volum. 57-62 /1971/
83. Kondorosi, A., Sik, T., Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 20 25-
84. a Kondorosi, A., L. Orosz, Z. Sváb, T. Sik, M.G.G. 132
153-163 /1974/
b Kondorosi Á.: Doktori értekezés /1972/
85. Gibson, A.H., Nutmann, P.S., Ann. Bot. 24 420-433 /1960/
86. Brewin, N.J., Beringer, A.W., Johnston, B., J. Gen. Microbiol. 120 413-420 /1980/
87. Sik, T. Kandidátusi értekezés /1967/
88. Depicker, A., van Montagu, M., Schell, J., in DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes ed. A.I. Bukhari, J.A. Shapiro CSH. pp.678-680 /1977/

89. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L., Heynecker, H.W., Boyer, J.H. Crosa, S. Falkow, Gene 2 95- /1977/
90. Orosz, L., Sik, T., Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 17 185-197 /1970/
91. Birnboim, H.C., Doly, J., Nucl. Acids Res. 7 1513-1523 /1979/
92. Grunstein, m., Hogness, P., P.N.A.S. 72 3961 /1975/
93. Raina, J.L., Modi V.V. J. Gen. Microbiol. 65 161-165 /1971/
94. Falkow, S., Infectious multiple drug resistance Pion, London /1975/
95. O' Gara, F., L.K. Dunican, J. Bacteriol. 116 1177-1180 /1973/
96. G. Selvaraj, V.N. Iyer Gene 15 279-283 /1981/
97. Clark, A.J., Warren, G.J., Annual Review of Genetics 13 99-125 /1979/
98. Hooykaas, P.I., den Dulk-Ras J.H., Schilperoort, R.A., Plasmid 4 64-75 /1980/
99. G. Riess, B., Masepohl, A., Puehler, A., Plasmid 10 111-118 /1983/
100. G.S. Bullerjahn, R.H. Benzinger J. Bacteriol. 150 /1/ 421-424 /1982/
101. G.B. Kiss, Zs. Kálmán, J. Bacteriol. 150 /2/ 465-470 /1982/
102. Hansen, J.B., Olsen, R.H., J. Bacteriol. 135 227-238 /1978/
103. H.O. Smith, D.B. Damer Ann. Rev. Biochem. 1981 50 41-68

