

A *Bacillus sphaericus* R restrikciós-modifikációs
rendszerének biokémiai jellemzése

Egyetemi doktori értekezés

Készült az MTA Szegedi Biológiai Kutató Központ
Biokémiai Intézetének Nukleinsav Csoportjában

Készítette: Konez Csaba
okleveles biológus

Szeged
1978.



Tartalom

I. Bevezetés

- 1/. A restrikció-modifikáció jelensége, definíciója
- 2/. A restrikciós-modifikációs rendszerek biokémiai jellemzése
- 3/. I. típusu restrikciós endonukleázok és modifikációs metilázok
- 4/. II. típusu restrikciós endonukleázok
- 5/. II. típusu modifikációs metilázok
- 6/. A restrikciós enzimek aktivitásának mérése
- 7/. Restrikciós, modifikációs enzimek tisztítása
- 8/. A II. típusu enzimek általános katalitikus jellemzői
- 9/. A restrikciós-modifikációs enzimek alkalmazása, szerepük in vivo
- 10/. A Bacillus sphaericus R restrikciós endonukleáza, az R.BspRI

II. Anyagok és módszerek

III. Eredmények értékelése és megvitatása

- 1/. Az R.BspRI restrikciós-modifikációs rendszer része
- 2/. Az R.BspRI tisztítása
- 3/. Az M.BspRI tisztítása
- 4/. Az R.BspRI és M.BspRI elektroforetikus analízise
- 5/. Az R.BspRI restrikciós endonukleáz jellemzése
- 6/. Az M.BspRI modifikációs metiláz jellemzése

IV. Összefoglalás



Rövidítések

R-M rendszer - restriktív-modifikációs rendszer

rel. eop. - /relative efficiency of plating/ fertőzési efficiencia

SAM - S-adenozil-L-/metil/-metionin

φX 174 RF - φX 174 fág DNS replikatív forma

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

TCA - triklór-ecetsav

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

Tris - tris-/hidroximetil/-amónometán

PPO - 2,5-difenil-oxazol

POPOP - 1,4-di-/2-,5-fenil-oxazol/-benzol

EtBr - ethidium-bromid

SS DNS, RNS - egyszálú DNS, RNS

DS DNS, RNS - kétszálú DNS, RNS

A restriktív és modifikációs enzimeket a Smith, Nathans /15/- féle nevezéktan szerint jelöltük, ahol a név első betűje az enzim forrását jelentő baktérium genusának a kezdőbetűje, a második két betű a species név első két betűje. Ha egy törzsből több restriktív enzimet izoláltak, az enzimek megkülönböztetésére további betű és számjelzést alkalmaztak. Az R restriktív endonukleáz, az M modifikációs metiláz jelöl. A következőkben a dolgozatban említett restriktív enzimek és a forrás baktériumok neveit adjuk meg.

endoR.EcoRI - *Escherichia coli* RY 13

endo R.EcoB, endoR.EcoK - *Escherichia coli* B ill. K

endoR.TaqI - *Thermus aquaticus* YTI

endoR.HhaI - *Haemophilus haemolyticus*

endoR.HaeIII - Haemophilus aegyptius
endoR.MboII - Moraxella bovis
endoR.Hind I, II - Haemophilus influenzae R_d
endoR.Hinf I - Haemophilus influenzae R_f
endoR.Pst I - Providencia stuartii
endoR.BamHI - Bacillus amyloliquefaciens H
endoR.Bst I - Bacillus stearothermophilus 1503
endoR.Bgl I, II - Bacillus globiggi
endoR.Sal I - Streptomyces albus
endoR.Sma I - Serratia marcescens S_D
endoR.Xma I - Xanthomonas malvacearum
endoR.Hga I - Haemophilus gallinarum
endoR.Ava I - Anabaena variabilis

A dolgozatban a restrikciós endonukleázok neveinek rövidített jelölését alkalmaztuk sok helyen, az egyszerűség kedvéért. pl. endoR.EcoRI helyett EcoRI

A modifikációs metilázok jelölése analóg a restrikciós endonukleázok jelölésével. pl. az endoR.EcoRI-nek megfelelő modifikációs metiláz neve methM.EcoRI vagy röviden M.EcoRI.

I. Bevezetés

1/. A restriktió-modifikáció jelensége, definíciója

A restriktió-modifikációs enzimek a restriktió-modifikáció mikrobiológiai jelenségéről kapták nevüket. A restriktió jelenségének részletes tanulmányozásával, az 1950-es évek elején, Luria és mtsi. /1/ foglalkoztak először, bakteriofág-sejt kölcsönhatások genetikai analizise során. A jelenség a következőképpen írható le:

- Egy A baktériumtörzsön /pl. E. coli K/ szaporított fággal B baktériumtörzset /pl. E. coli B/ fertőzve, az első szaporodási ciklusban a fág fertőzés hatásfoka /efficiency of plating, eop / az A törzsön észlelt érték ezred-tizezred részére redukálódik / relativ eop kb. 10^{-4} /, a B törzs restriktió aktivitása / r_B^+ / következtében.
- Ha az ily módon B törzsön szaporított fággal most az A törzset fertőzzük, a B törzsön észlelt eop értéknél 3-4 nagyságrenddel kisebb értéket kapunk az A törzs / r_A^+ / restriktió aktivitása következtében.

A jelenség mechanizmusának modelljeként 1962-ben Arber és Dussoix /2,3/ E. coli K és B törzseken végzett vizsgálataik alapján feltételezték, hogy minden baktérium, mely restriktió-modifikációs tulajdonságot mutat, rendelkezik egy endonukleolitikus és egy ezzel antagonista modifikációs enzimaktivitással.

- A restriktációs /r⁺/ fenotípusért felelős enzimek endodezoxi-ribonukleázok, melyek meghatározott nukleotidsorrendet ismernek fel és kettős szálú hasítást eredményeznek a DNS-ben.

- A modifikációs /m⁺/ fenotípusért felelős enzimek modifikációs metiltranszferázok, felismerőszekvenciájuk megegyezik a megfelelő restriktációs enzimével, a felismerőhely egyes bázisait metilálják úgy, hogy a modifikált DNS a restriktációs endonukleáznak nem szubsztrátja többé. A baktérium saját DNS-ét az a modifikációs aktivitás védi meg az endonukleolitikus hatással szemben, amíg a sejtbe jutó idegen DNS, amely nem rendelkezik ilyen modifikációval, gyorsan lebomlik a restriktációs endonukleáz hasítása és az azt követő exonukleolitikus emésztés hatására. / Az első replikációs ciklus után a "tulélő" fág DNS is modifikálódik./

Az elmúlt években néhány restriktációs-modifikációs rendszer részletes genetikai, biokémiai analizisét közölték. /4-14/

A restriktációs enzimek csoportjába sorolt fehérjék mind szekvenciaspecifikus endonukleázok. Korántsem igazolt a ma ismert, restriktációs endonukleázként tárgyalt enzimek túlnyomó többségére, hogy restriktációs-modifikációs rendszer részei, bár elnevezésük ezt feltételezi. /15/

A restriktációs-modifikációs enzimek biokémiai jellemzése 1968-ban indult meg /Meselson, Yuan /16/, Linn, Arber /17// az első restriktációs endonukleázok izolálásával. Igazi áttörés a II. típusu restriktációs enzimek felfedezésével és analitikai eszközként való felhasználásával /Smith és mtsi. /18,19,20/ következett be 1970-71-ben.

2/. A restriktációs-modifikációs rendszerek biokémiai jellemzése

A restriktációs endonukleázok eléggé általános jellemzői a baktériumoknak. Magasabbrendűekből eddig II. típusu restriktációs endonukleázokhoz hasonló restriktációs enzimaktivitást nem sikerült kimutatni /11/, ez azonban nem zárja ki analóg rendszerek létezését eucaryotákban is.

A restriktációs-modifikációs rendszerek jellemzői a következők:

- a/. Az endonukleáz specifikus oligonukleotid szekvenciát ismer fel a DNS-ben.
- b/. A hasítás a felismerőhelyen vagy attól bizonyos távolságban következik be.
- c/. Felismerőhely hiányában hasítás nincs.
- d/. A felismerőhely specifikus modifikációja /metilálás, glükozilezés / gátolja a megfelelő restriktációs enzim hasítását. / Egyes esetekben a restriktációs endonukleáz közvetlen gátlódik valamely fertőző fág termelte inhibitor által. /21,22//
- e/. A modifikációs metiláz felismerőhelye megegyezik a restriktációs endonukleázéval a DNS-en.
- f/. A modifikációs metiláz felismerőhelyenként két bázist /vagy adenint, vagy citosint/ metilál.

Az endonukleáz és metiláz génjét hordozhatja baktériumkromoszóma /EcoK és EcoB/, fágkromoszóma /EcoPI//23/, kriptikus profág /BsuRI//24/ és plazmid /EcoRI, EcoRII//13,25/.

A restriktációs-modifikációs enzimek nemcsak genetikai determináltságukban mutatnak alapvető eltéréseket, de biokémiai jellemzőikben is. Minden restriktációs endonukleáz specifikus szekvenciát ismer fel, de nem mindegyik hasít specifikus szek-

venciáknál. Ennek alapján a restriktív és modifikációs enzimeket két csoportba sorolják.

3/. I. típusu restriktív endonukleázok és modifikációs metilázok

Három alegységből álló bifunkcionális enzimek, restriktív és modifikációs aktivitással egyaránt rendelkeznek. Az endonukleolitikus működés SAM-t, ATP-t, Mg^{2+} -ot, a metiláz aktivitás csak SAM-t igényel. Azt, hogy a bifunkcionális enzim melyik aktivitása kerül előtérbe a felismerőhely állapota szabja meg.

a/. Mindkét szálon modifikált felismerőhelyű ill. felismerőhelyet nem tartalmazó DNS-sel enzim-szubsztrát komplex nem jön létre.

b/. Ha a felismerőhely modifikálatlan, az enzim a felismerőhelyen kívül kettős szálú hasítást eredményez. A hasítási pont randomnak tekinthető. A hasítást követően az enzim nagy hatásfoku ATP-ázzá alakul.

c/. Ha a felismerőhely egyik szála modifikált, a másik modifikálatlan, az enzim metilázként működik. Restriktív enzimként nem képes hasítani az ilyen "heteroduplex" felismerőhellyel rendelkező DNS-t. /26,27/

Ebbe a csoportba tartoznak az elsőként jellemzett restriktív enzimek, az EcoK és EcoB, valamint ide sorolják a sok hasonló tulajdonságot mutató EcoPI-et is. /16, 17, 23, 28-30/ Az EcoPI hasítási terméke az EcoK-hoz és EcoB-hez hasonlóan heterogén. Az endonukleáz Mg^{2+} -ot és ATP-t igényel, SAM növeli

a reakció sebességét. A hasítás befejeztével ATP hidrolízis nem történik.

4/. II. típusu restrikciós endonukleázok

A csoport enzimei a felismerőhelyen vagy attól kissé távolabb, de meghatározott helyen hasítanak, állandó számú, az enzimre jellemző méretű, mólsúlyu fragmentet hoznak létre egy adott DNS emésztése során. /10,11/

Ezek a fragmentek gélelektroforézissel egymástól elválaszthatók, jellegzetes sávzotottságot mutatva a gélképen. Két azonos specifitású enzim emésztési gélképe ugyanazzal a szubsztráttal megegyezik. Így valamely újonnan izolált restrikciós endonukleáz felismerőszekvenciája jelezhető, ha emésztési gélképét az eddig ismert restrikciós enzimek gélképeihez hasonlítjuk. Azonos ill. hasonló gélkép esetén, a DNS-t mindkét enzimmel együtt emésztve /kettős emésztés/, ha az egyedi emésztések gélképeihez viszonyítva új sáv, fragment megjelenését nem észleljük, a két enzim isoschizomer, azonos szekvenciát ismer fel a DNS-ben.

A II. típusu restrikciós enzimek általában kis mólsúlyú fehérjék, aktivitásukhoz csupán Mg^{2+} -ot igényelnek. Az eddig ismert II. típusu enzimek nagyrészt kétszeres rotációs szimmetriájú, 4, 5, 6, nukleotid hosszú szekvenciát /un. palindromot pl. 5' G-G-C-C 3' HaeIII / ismernek fel. / A felismerő-
C-C-G-G
hely palindrom, ha a két komplementer szál azonos irányban olvasva /pl. 5'-3'/ azonos nukleotidsorrendet ad./

Hasonló típusu szimmetriát mutató szekvenciák találhatóak egyéb protein-DNS kölcsönhatási /kötő-/ helyeken pl. promoterek, operátorok. /31/

Kiemelkedő analitikai szerepük magyarázza, hogy jóval több II. típusu endonukleáz ismert, mint I. típusu. Az eddig felfedezett 145 enzim kb. 45-50 specifitást jelent. / Jelenleg az ismert felismerőszekvenciák alapján 87 enzimet 37 csoportba sorolhatunk./

Egyes baktérium genusokból igen sok II. típusu restriktív enzimet izoláltak. /Igy pl. a Haemophilus törzsek, ahol 29 megvizsgált törzsből 22 enzimet izoláltak /11/, vagy a Bacillus genus, ahol 62 törzsből 20-ban mutattak ki restriktív endonukleáz aktivitást. /33//

Az isoschizomer baktériumtörzsek ill. endonukleázok értékét praktikus szempontok határozzák meg /pathogenitás, előállítási költség, mennyiség/. Egyesek alig detektálható mennyiségű enzimet tartalmaznak /33/, amíg az ellenkező véglet pl. az általunk tisztított R.BspRI, ahol 10g sejtből izolált homogén enzim 5 g DNS-t képes megemészteni 1 óra alatt.

Külön érdekességet jelent az az isoschizomer csoport, ahol az azonos felismerőszekvencián belül a hasítási helyek különbözők /pl. SmaI, XmaI/, ill. amelyek más genus valamely fájában található több különböző specifitású restriktív enzimmel isoschizomer enzimeket termelnek. / pl. a Gram-negatív Haemophilus enzimeit a HindII és HindIII isoschizomerek a Gram-pozitív Corynebacterium humiferum enzimeivel a ChuI ill. ChuII-vel./

Meglepő különbséget mutat a Diplococcus pneumoniae enzime a DpnI, amely a hasításhoz metilált felismerőszekvenciát

igényel / 5' G-A-T-C^x 3' , ahol x a metilcsoport helyzetét jelöli//34, 35/, szemben isoschizomerjével, a DpnII-vel, mely metilálatlan szekvenciáknál hasít.

A HgaI, HphI és MboII az I. típusu enzimekhez hasonlóan, a felismerőhelyen kívül, ellentétben az I. típusuakkal, meghatározott helyen hasítanak, így specifikus fragmentálást okoznak. /pl. HgaI 5' G-A-C-G-C-N-N-N-N-N 3' /
C-T-G-C-G-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N

A HinfI, HaeII, HindII, AvaI és isoschizomerjeik bizonyos "pontatlanságot" engednek meg felismerőhelyükön /pl. HindII 5' G-T-Py-Pu-A-C 3'/.

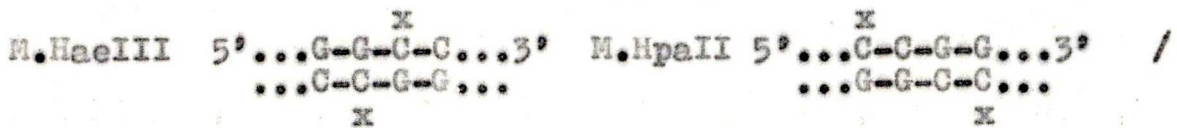
A hasítási helyek természetében is lényeges eltérést találunk az enzimek között. Létrehozhatnak különböző nukleotid-hosszuságu 5' /pl. EcoRII - 5, EcoRI - 4, HinfI - 3, HpaII - 2 nukleotid/, 3' egyesszálu /Pst - 4 / ill. kettősszálu fragmentvégeket.

Az egyesszálu fragmentvégek megfelelő körülmények között DNS-ligázzal összekapcsolhatók /ld. alkalmazás/.

5/. II. típusu modifikációs metilázok

A II. típusu modifikációs metilázok kevésbé ismertek, mint endonukleáz párjuk. Csak néhány modifikációs metilázt tisztítottak /13, 36-39/ és alig több azoknak az enzimeknek a száma, amelyennél meghatározták a metilált bázis helyzetét a felismerőszekvenciában.

Metiltranszferázként egy-egy metil-csoportot visznek át a kettős szálu DNS szálaira felismerőhelyenként a SAM-ról. /pl.



Adenin ill. citozin specifikus metil-transzferázként 6-metiladenint ill. 5-metil-citozint hoznak létre, ezzel feltehetően a felismerőhely adeninjének 6-os, citozinjének 5-ös pozíciójával szoros kölcsönhatásba kerülő restriktív endonukleázok szterikus gátlását okozzák. /39/

A természetes metilálásnak csupán töredék része modifikációs metilázok működésének eredménye legtöbb baktériumban. Előfordulhat, hogy /nem restriktív rendszerhez tartozó/ egyéb metilázok vagy más modifikáló enzimek a felismerőhely bázisait módosítják /pl. glükozilezik/, megvédik a DNS-t a restriktív endonukleáz hasításával szemben. /34, 36/ Plazmid /pl. EcoRII/ vagy fág-specifikus restriktív-modifikációs rendszert hordozó baktériumokban igen szoros funkcióbeli kölcsönhatás valósul meg a gazdasejt ill. az R-M rendszer metilázai között. /35/. Azok a feltevések azonban, amelyek szerepet tulajdonítanak a modifikációs metilázoknak és az általuk bekövetkező helyspecifikus DNS metilálásnak a transzkripció, génfunkciók kontroll mechanizmusában, jelenleg nem megalapozottak. /35/

A metiláz aktivitás detektálására és mérésére alkalmas a restriktív enzimeknél használt tesztek nagy része, felhasználva, hogy az előzetes metilálás megvédi a DNS-t az endonukleolitikus hasítástól. /37/ Kvantitatív tesztként alkalmazható a metilcsoportján /C¹⁴, H³ / jelzett SAM-nal végzett metilcsoport beépítési teszt. /36, 38/

Az első tisztítások során a restriktációs enzimek aktivitását a biológiai aktivitás /12//transzformációs, transzfekeciós tesztek/, DNS szedimentációs sebesség /16, 18/ modifikált kontrollhoz való viszonyításával követték. Kevésbé időigényes, alacsony szintű exonukleáz jelenlétében is hasonlóan kvantitatív tesztek: a DNS viszkozitáscsökkenés mérése /18/, exonukleázzal szemben érzékeny formába való átalakításon alapuló módszer /29/, filter-kötési eljárások /40/, valamint szilárd fázishoz kötött radioaktív DNS-ből oligonukleotid felszabadulás sebességét mérő módszer /41/. A kvalitatív, de félkvantitatívra tehető tesztek közül legegyszerűbb / enzimentisztítás során célszerű/ a csapadék /clot-/ teszt /42/, amelynek lényege, hogy az emésztett DNS, bovinalbumin jelenlétében TCA-val finom csapadékot képez, szemben a fibrózus, turós csapadékot adó emésztetlen DNS-sel.

Legáltalánosabb a "gélmeghatározás" /Sharp 43, 44/. Akrilamid, agaróz géleken, ethidium-bromiddal való festés után, az emésztési fragmentek UV fényben láthatóvá tehetőek. Előnye, hogy nemcsak a specifikus fragmentációt eredményező endonukleáz, hanem aspecifikusan emésztő nukleázok jelenlétét is jelzi. Ezzel a módszerrel meghatározható az a legkisebb enzimmennyiség, amely 1 óra alatt $1 \mu\text{g}$ λ DNS-t emészt meg tökéletesen. Ezt használják fel az aktivitás mennyiségi meghatározásához. / λ E, λ határ/

7/. A restriktációs, modifikációs enzimek tisztítása

A II. típusu restriktációs endonukleázok analitikai eszköz-

ként való felhasználása kiemelkedő jelentőségű. Ez magyarázza, hogy bár igen sok restriktív enzimet fedeztek fel, a tisztítási eljárások során elsősorban a közvetlen gyakorlati felhasználás igényeit tartották szem előtt. Az enzimpreparátumokkal szemben támasztott gyakorlati igények:

- mentes legyen aspecifikus nukleázoktól
- a tisztított enzim stabil legyen, mentes szennyező proteázoktól.

Eddig csak az EcoRI /38, 45/, BamHI /46/, és BstRI /47/ restriktív endonukleázokat tisztították homogenitásig.

A leírt tisztítások általános sémába foglalhatók.

A nyers kivonat nukleinsavmentesítése történhet: Biogél kromatográfiával, streptomycin-szulfátos kicsapással, hidroxilapatit kromatográfiával vagy DEAE-cellulóz kromatográfiával.

Ezt általában $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ kisózás, majd DEAE-cellulóz vagy foszfecellulóz kromatográfia, esetleg mindkettő, követi. Néhány restriktív enzim tisztításánál egyéb eljárásokat is felhasználtak. Sikeresen alkalmazták a HpaI tisztításánál /48/ a glikogén-szintetáz tisztításánál használt hidrofób kromatográfiát ω -aminoalkil-Sepharose oszlopon. / Az alkillánc 3, 5, 7 szénatomos lehet. /49//

Különösen fontos az in vitro rekombinációs kísérletekben a "ragadás", egyes szálu fragmentvégeket eredményező restriktív endonukleázok tökéletes mentesítése szennyező exonukleázoktól.

Óriási tisztulás érhető el SS DNS.agaróz, DNS-cellulóz affinitás-oszlopok alkalmazásával. Elméletileg a restriktív enzimek nem kötődnek a SS DNS.agaróz oszlopon, mivel DS DNS-

specifikusak, így elkülöníthetők az egyes szálu DNS-re specifikus nukleázoktól, melyek az oszlopon erősen kötődnek.

Sok tekintetben egyszerűbbé és gyorsabbá tette a restriktív enzimek tisztítását a nemrégiben számos enzim izolálásánál alkalmazott Polymix P /polietilén-imin/ frakcionálást követő heparin-agaróz affinitáskromatográfiát alkalmazó eljárás.

/ 50, 51/

A modifikációs metilázok közül az EcoRI, HpaII, HaeIII és Hind metilázok tisztításáról rendelkezünk adatokkal. /36, 38, 39/ A metilázok tisztítására az endonukleázokéhoz hasonló általános séma jelenleg nem adható meg.

Az M.EcoRI tisztítása követi az EcoRI tisztítás menetét a foszfocellulóz ill. hidroxilapatit kromatográfiáig. /38, 88/ A Hind metilázokat ammóniumsulfát kicsapás után ismételt foszfocellulóz kromatográfiákkal választották el egymástól, az M.HindII-t Sephadex G-200-on tisztították tovább.

Felhasználhatók azonban, a restriktív enzimek tisztítása során sikerrel alkalmazott egyéb más módszerek is /pl. egyes szálu DNS.agaróz kromatográfia /39//.

8/. A II. típusu enzimek általános katalitikus jellemzői

Endonukleázok

Jelenlegi tudásunk a II. típusu restriktív enzimek katalitikus tulajdonságairól - kivéve az EcoRI-et - minimális.

Hasításuk 3'-OH, 5'-foszforil fragmentvégeket eredményez.

Kis mólsúlyu fehérjék /30.000-50.000 D/, széles pH, Mg^{2+} optimummal rendelkeznek. A nagy ionerősség gátlólag hat működésükre. Az eddig ismert enzimek Mg^{2+} -on kívül kofaktorként mást nem igényelnek, Cu^{2+} , Zn^{2+} inaktiválódást okoznak. /13, 52/
A pH és ionerősség a specifitásra is hatással lehet, bár erre eddig csak egy példa ismert / EcoRI - EcoRI^{II}/. /53/

Általában kettős szálu DNS-t képesek csak hasítani, néhány restriktációs enzim / HaeIII, HhaI, MboII, HinfI, HpaII / az egyszálu DNS-t is emésztí /pl. a ϕ X 174 ill. fl egyszálu DNS-eket a ϕ X 174 ill. fl RF DNS-nek megfelelő helyeken hasítja a HaeIII/, azonban a hasítási sebesség jóval kisebb, mint kettős szálu DNS esetén. / 54-56 /

Alegységszerkezetüket tekintve, feltételezik, hogy in vivo dimerként ill. tetramerként fordul elő. Ennek alapján levezethető lenne a hasítás mechanizmusa és feltételezhetnénk, hogy a dimer fehérjeszerkezetében megtalálható a felismerőhely kétszeres rotációs szimmetriájának megfelelő konformáció. / Az EcoRI disszociációs konstansa 1×10^{-7} , in vivo az enzim kb. 80%-a tetramerként fordul elő. /45//

A hasítás kinetikai paramétereinek meghatározásához szükséges volt olyan mérési módszerek kidolgozása, melyek segítségével a reakció kvantitatív módon követhető. A foszfodiészter kötések hasításának, hidrolizálásának sebessége pontosan csak olyan szubsztrátok felhasználásával határozható meg, amelyek az adott enzimre csak egy felismerőhelyet tartalmaznak.

/ Az EcoRI-nél pl. SV 40, Col E1 DNS-ek//38, 45/



A reakció Michaelis-Menten kinetikát követ. / Az EcoRI-re $K_m = 8\text{nm}$, az átviteli szám 3,8 Col El DNS szubsztráton 37°C -on, 0,72 30°C -on./ A hasítás módja hőmérsékletfüggő. Az EcoRI-nél 0°C körüli hőmérsékleten a DNS egyik szála hasítódik csak, majd az enzim a szubsztrátról disszociál. 30°C -on az enzim mindkét szálat hasítja. A sebességmeghatározó lépés feltehetően az enzim-szubsztrát komplex disszociációja. /45/

Több felismerőhelyet tartalmazó DNS-ek részleges emésztési termékeinek vizsgálata bizonyítja azt, hogy az egyes helyeket a szubsztráton az enzim nem ugyanazzal a sebességgel hasítja. /57, 58/ Az egyes helyek hasítási sebessége között nagyságrendi különbség is lehet. Tekintve, hogy minden egyes szubsztrát /felismerő-/ hely ebben az esetben azonos, ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a felismerőhelyek körüli DNS szakasznak is fontos szerepe van az enzim-szubsztrát kölcsönhatásban. Ezt támasztják alá azok a kísérletek is, amelyeket az EcoRI enzimmel és egy szintetikus, az enzim felismerőhelyét tartalmazó oktanukleotid szubsztráttal végeztek. /38/

Metilázok

A metilálás kinetikájára vonatkozóan csak néhány adat áll rendelkezésünkre. A reakció valószínűleg Michaelis-Menten kinetikát követ. /36/

- 9/. A restriktációs-modifikációs enzimek alkalmazása, szerepük in vivo

A restriktációs enzimek felhasználása a DNS struktúra és funkció analizisében valóságos forradalmat idézett elő az utóbbi három évben a molekuláris biológiában. Ehhez igen nagy segítséget nyújtott a gélelektroforetikus technika fejlődése, amely lehetővé tette a restriktációs enzimek emésztési fragmentjeinek méretmeghatározását 20-40 nukleotid pontossággal, sorrendjük megállapítását, ezáltal pontos fizikai térképek készítését. A fizikai térképek összevetése a géntérképekkel lehetővé tette a funkciók kromoszómális elhelyezkedésének megállapítását, a génexpresszió biokémiai analizisét. A restriktációs enzimek nélkülözhetetlen eszközeivé váltak a DNS szekvenálásnak, mely a direkt kémiai módszer bevezetésével az elmúlt évben nagyot lépett előre. /59/ A helyspecifikus hasítás lehetőséget adott az in vitro rekombinációs kísérletekhez, melyek felhasználási területe szinte beláthatatlan. /11/ A DNS specifikus fragmentálása, a fragmentek DNS-ligázzal történő összekapcsolása, ezáltal új rekombináns genomok konstruálása vetette fel a lehetőséget, hogy a restriktációs endonukleázok in vivo hasonló funkcióval rendelkezhetnek. /11,12/

Ezt a feltevést Chang és Cohen /60/ igazolta ez évben. / Feltételezve egy sor, a természetben gyakori, plazmidtranszfert különböző restriktációs-modifikációs rendszert hordozó baktériumok között, ilyen helyspecifikus rekombinációs folyamatok a plazmidok teljes strukturális átrendeződését eredményezhetik például./

Nem elképzelhetetlen, hogy a restriktációs-modifikációs enzimek fő szerepe, a jelenleg elfogadott "lebontó-védelmi" funk-

cióval ellentétben, in vivo, a plazmidok, bakteriális kromoszómák helyspecifikus rekombinációs folyamataiban nyilvánul meg. / Az EcoRI-el nyert adatokat látszanak alátámasztani a korábban a Bacillus subtilis restriktív-modifikációs rendszerével végzett genetikai vizsgálatok is./

10/. A Bacillus sphaericus restriktív endonukleáza, az R.BspRI

A Bacillus sphaericus R törzset az SZBK Biokémiai Intézetében izolálták. Taxonómiai azonosítását Ivanovics György professzor végezte el. Részleges mikrobiológiai jellemzése R-M rendszer jelenlétére utalt. /61/ Ezzel egyidőben fedezték fel és tisztították részlegesen restriktív enzimét, az R.BspRI-et, amely igen előnyös tulajdonságokat mutatott. Igen nagy mennyiségben izolálható / 2.600.000 λ E/ 10g sejt/, a tisztítás során rendkívül stabil, szemben isoschizomerjeivel. /62/

Isoschizomer csoportjában a biokémiai gyakorlatban leg többet használt két enzim a BsuRI és a HaeIII. Egyik kitermelése sem éri el az R.BspRI-ét /HaeIII esetén 50.000 λ E/10g sejt/. A BsuRI kevésbé stabil.

Az R.BspRI előnyös tulajdonságai felvetették egy modellrendszer megalkotásának lehetőségét, mely eszközzel szolgálhatna DNS-fehérje helyspecifikus kölcsönhatások vizsgálatához.

Az R.BspRI és a hozzá kapcsolódó modifikációs metiláz - két azonos felismerőhelyű, de eltérő funkciójú enzim - fehérjekémiai, szerkezeti analízise, valamint az így nyert adatok

összevetése az isoschizomer enzimek hasonló analiziséből nyert adatokkal érdekes információkat szolgáltatna a restriktíós-modifikációs rendszerek evolúciójával, a restriktíós és modifikációs enzimek térszerkezeti, működési sajátosságaival kapcsolatban.

Célkitűzés

Munkánk alapvető célkitűzése volt az

- R.BspRI tisztítása homogén formába, reprodukálható tisztítási eljárás kidolgozása
- Igazolni, hogy az R.BspRI valóban restriktíós-modifikációs rendszer része
- Jellemezni a reakció optimális körülményeit
- Vizsgálni az enzim szubsztrátspecifitását, elsősorban azt, hogy emészti-e az egyes szálú DNS-t, az egyszálú ill. kettős szálú RNS-t.

Feltételeztük, hogy r^+m^+ fenotípus esetén az endonukleázhoz hasonló mennyiségben kell modifikációs metiláznak is termelődni. Ezzel kapcsolatban, a metiláz aktivitás kimutatása után célunk volt

- az M.BspRI tisztítása és jellemzése

II. Anyagok és módszerek

Baktériumtörzsek, bakteriofágok és táptalajok

Felhasznált baktériumtörzsek és alkalmazásuk

A törzs			
neve	jellemezője	alkalmazása	eredete
Bacillus sphaericus R	r_{sm}^+	R.BspRI és M.BspRI enzimek, Bsp DNS, plazmid DNS preparálás	SzBK Biológiai Intézet
E. coli HF 4714	szupresszor törzs	$\phi X 174_{am3}$ fág szaporítása	Hutchison C.A.
E. coli C	vad típus	$\phi X 174$ és $\phi X 174$ RF DNS preparálás	Hutchison C. A.
E. coli K12 / λ cI857 S7 /	hőindukálható lizogén	λ cI857 S7 DNS preparálás	N. I. Matvienko

Bakteriofágok: $\phi X 174_{am3}$ - $\phi X 174$ amber mutánsa, lizis defektív
/ Hutchison C.A./ λ cI857 S7

Táptalajok:

YT-táptalaj: 5g Bacto-yeast extrakt, 10g Bacto-trypton.
5g NaCl /1 liter

KC-táptalaj: 10g Bacto-trypton, 5g KCl, 5g glukóz /1 liter +
 $10^{-3}M$ CaCl₂

KC-alapagar: 10g Bacto-trypton, 2,5g KCl, 10g agar, 1 ml
1 M CaCl₂ / 1 liter

KC-fedőagar: KC-táptalaj + 7g agar + 0,5ml 1 M CaCl₂/ 1 liter

SL-táptalaj: 10g Bacto-trypton, 3g NaCl, 5g KCl, 10g glukóz /
1 liter + 10⁻³M CaCl₂

TPG-táptalaj: /63/- szerint, 5ml/ 1 liter 5%-os casaminosav-
val kiegészítve

Enzimek, fehérjék

BSA /marha szérumalbumin/ /Calbiochem grade B/, lizozim,
RN-áz A /Reanal/, DN-áz /RN-áz mentes/, cytochrom C /Worthing-
ton/, proteínáz K /Merck/, E. coli RNS-polimeráz /64/, Asper-
gillus oryzae S1 nukleáz /65 szerint tisztítva, Uvárdy A-tól/

Restriktációs endonukleázok

EcoRI /38/, HindII, HindIII /66/, HpaI, HpaII /67/, BamHI
/68/, SmaI /66/, Sali /66/-szerint tisztítva / Sain Bélától/

DNS-ek, RNS-ek

Csirke vvt. DNS /Reanal/, borju timusz DNS /Calbiochem/,
E. coli /H³/DNS /Sain B., Kiss A-tól/, E. coli 16S, 23S rRNS
/P³² ill. H³ jelzett,/69/, Kiss I-től /, Sindbis virus RF
RNS /Duda E., Erdei S-től/

A λ cI857S7 fág DNS-t a bakteriumsejtek feltárása után
végzett DN-ázos kezeléssel, majd CsCl sűrűségi gradiens cent-
rifugálással és fenolozással tisztítottuk. /70/

A Bacillus sphaericus R DNS preparálást Marmur módszerével
/71/ végeztük, az E. coli /H³/DNS-t /72/ szerint preparáltuk.

A fágokból izolált DNS-t 10mM Tris.HCl /pH 8.0/, 10mM NaCl, 1mM EDTA-t tartalmazó pufferben vettük fel ill. hígítottuk.

A DNS oldatok koncentrációját Gilford spektrofotométeren mért E_{260} értékekből határoztuk meg. /1E = 50 ug/ml DNS /

ØX 174_{am3} RF DNS preparálása

A megfelelő titer / 10^{12} - 10^{13} ø/ml/ eléréséig a ØX 174_{am3} fágot az E. coli HF 4714 szupresszor törzsön szaporítottuk, KC-táptalajon /73/ szerint.

SL-táptalajon növesztett E. coli C kulturát /OD₅₅₀ 0.4-0.5/ / 5×10^8 sejt/ml/ denzitásnál 5-10-szeres multiplicitással fertőztük ØX 174 fággal, 37 °C-on. 10 perccel a fertőzés után 30 µg/ml chloramphenicol /Reanal/ adtunk, hogy a fágérést gátoljuk. / A fág DNS ebben a stádiumban kétszálu un. replikatív formában van/. A sejtkulturát 2.5 órai rázatás után lehűtöttük, 5mM EDTA-val kiegészítettük, centrifugáltuk /10.000g, 30 min/. A ØX 174 RF DNS-t az általánosan használt plazmid-izolálási módszer /Clewell, Helinski 74/ módosításával preparáltuk.

A centrifugált, 25% szacharóz, 50mM Tris.HCl /pH 8.0/ pufferben szuszpendált E. coli sejteket 1 mg/ml lizozimmal /0.25M Tris.HCl /pH 8.0/ pufferben, 5 perc, 0°C/, majd EDTA /pH 8.0/ adása után /25 mM végkoncentrációig/ egyenlő térfogatu Triton-eleggyel /0.1% Triton X-100, 50mM Tris.HCl /pH 8.0/, 0.065M EDTA, 20 perc, 0°C/ tártuk fel. A membránhoz tapadt baktérium DNS kiülepitése után /42.1 rotor, 25.000rpm, 1 óra / a cir-

kuláris, ún. supercoiled ϕ X 174 RF DNS-t CsCl-ethidium-bromid egyensúlyi sűrűségi gradiensen tisztítottuk. / A CsCl-EtBr egyensúlyi gradiens centrifugálást $1,58 \text{ g/cm}^3$ CsCl, $500 \text{ } \mu\text{g/ml}$ EtBr, 35.000 rpm mellett, Beckman 42.1 rotorral, 60 óráig végeztük. / Az ethidium-bromidot i-amilalkoholos extrahálással távolítottuk el, a DNS-t 20mM Tris.HCl /pH 7.4/, 2 mM EDTA pufferrel szemben dializáltuk, majd /ugyanezen pufferrel telített fenollal/ fenoleztük és ismét dializáltuk.

^{32}P - ϕ X 174 DNS preparálása

500 ml TPG táptalajon növesztett E. coli C kulturához $\text{OD}_{550} 0.4$ denzitásnál $30 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P -ortofoszfátot /hordozó mentes/ adtunk, 5 perccel a fágfertőzés előtt, majd 5-10-szeres multiplicitással fertőztük ϕ X 174_{am3} fággal. A tenyészetet 3 óráig rázattuk 37°C -on, majd lehűtöttük, a sejteket centrifugáltuk / 15.000g , 30 perc/.

A sejteket 10 ml 50mM Na-tetraborát, 5mM EDTA pufferben szuszpendáltuk, majd lizozimes kezelés / 0.3 mg/ml , 30 perc, 37°C / és néhány csepp kloroform adása után, háromszori fagyasztás-melegítéssel feltártuk. 10mM MgCl_2 -ot adtunk, majd a bakteriális DNS-t és RNS-t $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ DN-ázzal ill. RN-ázzal emésztettük. / 37°C , 30 perc/ EDTA-t adtunk 25mM végkoncentrációig, majd a sejttörmelékét lecentrifugáltuk. / Beckman J-21, JA-20 rotor, 18.000 rpm , 1 óra, 4°C /

A fágot tartalmazó felülusszót lépcsős CsCl gradiensre / 1,3;

1.5; 1.7 g/cm³/ rétegeztük, 24.000 rpm-mel, Beckman SW 25.1 rotorral, 3 óráig centrifugáltuk, a fának megfelelő réteget leszivtuk és újabb CsCl egyensúlyi gradiensen tisztítottuk. / A CsCl kezdeti sűrűsége 1,4 g/cm³ volt, a centrifugálást Beckman SW 56-os rotorban, 50.000 rpm-mel, 36 óráig végeztük./

A fényszórása alapján felismerhető fágcsíkot leszivtuk, majd egy éjszakán keresztül 10mM Tris.HCl /pH 8.0/, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5% SDS pufferrel szemben dializáltuk. 50 µg/ml proteínáz K-val / 2 óra, 37°C/ történő emésztés után / 50mM Tris.HCl /pH 8.0/, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5% SDS/ pufferrel telített fenollal extraháltuk. Az egyes szálu fág DNS-t 10mM Tris.HCl /pH 7.5/, 10mM NaCl, 1mM EDTA pufferrel szemben dializáltuk.

Egyik szálu /P³²/-jelzett hibrid duplex ØX 174 DNS
preparálása

A cirkuláris, kettős szálu /RFI/ ØX 174 DNS-t HpaI emésztéssel linearizáltuk / 2 óra, 100 λE HpaI, 100 µg ØX 174 RFI, 37°C // A HpaI a ØX 174 RFI molekulát három helyen hasítja/ majd 0.15M Na-foszfát /pH 6.8/, 1mM EDTA pufferrel szemben dializáltuk.

Egyenlő mennyiségű /100 µg/ /P³²/ØX 174 /egy szálu/ DNS-sel való összekeverés után az elegyet 100°C-on 5 percig denaturáltuk. / Az oldat DNS koncentrációját úgy választottuk meg, hogy h= 3-4 óra, 50-100x c₀t, ahol c₀t=0.01 mellett a következő közelítő egyenlőség érvényesüljön, $\frac{E_{260}}{h} = c_0 \cdot t / 2$

Az elegyet 60 °C-on 4 óráig hibridizáltuk, majd 0.15M Na-



foszfát, 1 mM EDTA /pH 6.8/ pufferrel ekvibrált hidroxilapatit oszlopra vittük. /1-2 ml-es oszlop, 60 °C /

Az egyes szálu DNS az oszlopon átfolyik, /20-szoros oszlop-térfogat/ pufferrel való mosás után a kettős szálu DNS-t 0.3M Na-foszfát, 1mM EDTA /pH 6.8/ pufferrel eluáltuk. A radioaktiv kettős szálu frakciót 30mM Na-acetát /pH 4.6/, 50mM NaCl, 1mM ZnCl₂, 5% glicerin pufferrel szemben dializáltuk /3 óra/, majd *A. oryzae* S1 nukleázzal emésztettük / 2 óra, 37 °C/. / Az S1 nukleáz emésztéssel eltávolítottuk az esetleg még jelen lévő /P³²/ egyszálu, szennyező DNS-t. Az emésztést kb. háromszoros mennyiségű egyes szálu DNS emésztéséhez elegendő mennyiségű S1 nukleázzal végeztük./ A DNS-t ezután fenollal extraháltuk, majd 0.1 térfogat 20%-os K-acetát adása után, 2 térfogat absz. alkohollal -70 °C-on kicsaptuk /1 óra/, majd centrifugáltuk /18.000 rpm, J-21, JA-20 rotor, 1 óra/ Az így készített "heteroduplex DNS-t Bsp-pufferben oldottuk fel.

Egyik szálán metilált, másik szálán /P³²/-jelzett hibrid duplex ØX 174 DNS készítése

A cirkuláris ØX 174 RFI molekula HpaI emésztéssel való linearizálása után / 100 µg ØX 174 RFI DNS, 100 U E HpaI, 2 óra, 37 °C, majd 20mM EDTA / a ØX 174-HpaI fragmenteket M.BspRI metilázzal metiláltuk / 5 óra, 37 °C, 24 µM SAM, 150-200 U M.BspRI /, majd a metilálás teljességét R.BspRI emésztéssel ellenőriztük. A továbbiakban az egyik szálán metilált ØX 174 "heteroduplex" preparálását az előzőekben leírt módon végeztük.

Egyéb felhasznált vegyszerek és anyagok

Az enzim tisztításokhoz és elektroforézishez felhasznált vegyszerek Merck ill. BDH /Analar/ gyártmányúak voltak. További, kísérleteinkhez felhasznált vegyszerek: agaróz /Sigma/, glicerin /BDH, Merck/, S-adenozil-L-/metil/-metionin-klorid /Sigma/, foszfocellulóz /Whatman P11/, DEAE-cellulóz /Whatman DE 52/, CM-cellulóz /Whatman CM 52/, SDS /Na-dodecil-szulfát/ /Serva/. A DNS.agarózt /75, 76/ szerint készítettük, csirke vvt. DNS felhasználásával. A hidroxilapatitot /77/ alapján készítettük.

Izotópok

S-adenozil-L-/C¹⁴-metil/-metionin /60.3 µCi/µmól, Radiochemical Centre, Amersham/, S-adenozil-L-/H³-metil/-metionin /10,6 Ci/mmól, Amersham/, P³²-ortofoszfát / Izotóp Intézet, Budapest/

Filterek, vékonyréteg

Nitrocellulóz filterek /Sartorius/, üvegfilterek /GF/C/, DE 81 kromatográfiás papír /Whatman/, Fixion-50 X8 /Chinoin/

Festékek

Ethidium-bromid /Calbiochem, B grade/, brómfenolkék /Calbiochem/, Stains all /SERVA/, Coomassie Brilliant Blue /Serva/

Restriktációs endonukleáz reakciók

Az emésztési elegyek általában 1-2 µg / egyes esetekben ennél több/ DNS-t tartalmaztak, az alkalmazott enzimmennyiségek reakciótól függően változtak 0.1-10.000 λegységig. Az emésztési idők általában 1 óra időtartamúak voltak, részleges emésztéseknél 5-30 perc, prolongált emésztéseknél 2-24 óra. Az emésztéseket a SmaI esetében 30°C-on, az összes többi enzimmel pedig 37°C-on végeztük.

Egy tipikus emésztési reakcióelegy összetétele a következő volt 25, 50, 100 µl térfogatokban: 5x tömény enzimpuffer, DNS /λ, φX 174 RF/, enzim, H₂O.

EcoRI-puffer: 0.1M Tris.HCl /pH 7.5/, 5mM MgCl₂, 0.05M NaCl

Hind-puffer: 10mM Tris.HCl /pH 7.5/, 10mM MgCl₂, 10mM 2-mercaptoetanol

Sma-puffer: 15mM Tris.HCl /pH 9.0/, 6mM MgCl₂, 15mM KCl

Bsp-puffer: 25mM Tris.HCl /pH 8.2/, 50mM NaCl, 20mM MgCl₂

A HindII, HindIII, HpaI, HpaII, BamHI, Sali emésztésekhez

Hind-puffert használtunk. A reakciókat 1/5 térf. 50% szacharóz, 0,2M EDTA, 0.1% brómfenolkék oldattal ill. 0.1M EDTA, 50% glicerin oldattal állítottuk le.

Gélelektroforézis

I. a/. A fehérjeelektroforézist 0.1% SDS jelenlétében Weber és Osborn /78/ módszere szerint végeztük. A minta előkészítés módja néhány esetben ettől eltérő volt. A fehérjemintát 1.5M Tris.HCl /pH 8.3/, 1% 2-mercaptoetanol, 1% SDS jelenlétében

37 °C-on, 4 óráig, 50 mg/ml jód-acetamid /Serva Chem. Co./ adása után további 1 óráig inkubáltuk, majd 10mM KH_2PO_4 /pH 7.2/, 0.1% SDS, 0.1% 2-mercaptoetanol pufferben / SDS-elektroforézis minta puffer/ dializáltuk és 10%-os glicerinben vittük géltre. Az elektroforézis után a géleket 0.2%-os Coomassie Brilliant Blue festékkoldattal / 0.2g Coomassie/ 100ml metanol-viz /1:1/ elegye; felhasználás előtt 7ml jégecetot adunk az oldathoz/ festettük 2 óráig, majd deszt. vizes öblítés után géldifferenciáló oldattal /25 ml metanol, 37.5 ml jégecet, vízzel 500 ml-re kiegészítve/ differenciáltuk.

b/. A fehérjeelektroforézist nativ körülmények között Tris.glicin pufferben, Jovin /79/ szerint végeztük, kivéve, hogy katalizátorként riboflavint használtunk.

/ A fehérjék elektroforézise során 7.2; 7.5%-os géleket / csöves/ 0.6x 13 ill. 0.6 x 15 cm/ és lemez /15 x 21 cm/ géleket/ készítettünk. SDS elektroforézis esetén a mintákat 40-60V/40-60mA-rel 10-16 óráig, nativ gélek esetén 4°C-on , 100-120V/10-40mA-rel 4-8 óráig futtattuk.

A festett fehérjesávok abszorpcióját 550nm-nél, Gilford spektrofotométeren, kiiró feltétellel követtük.

II. A DNS mintákat akrilamid vagy agaróz géleken elektroforétizáltuk.

a/. Akrilamid elektroforézis esetén a gélek összetétele a következő volt: 4% akrilamid, 0.2% bis-akrilamid, 0.1% ammónium-perszulfát, 0.01 térf.% TEMED. Az elektroforézis-tartály-puffer 40mM Tris.HCl /pH 8.0/, 20mM Na-acetátot és 1mM EDTA-t tartalmazott. A futtatást 60-80 V/40-60mA-rel végeztük, rend-

szerint 2-3 óráig. Futás után a géleket 0.5 µg/ml ethidium-bromiddal festettük gélpufferben 20-30 percig, majd rövid hullámhosszu UV lámpa alatt értékeltük ill. fényképeztük narancsvörös szűrőt használva.

b/. Ha a DNS mintákat agaróz gélen elektroforetizáltuk, az elválasztáshoz 0.7-2%-os agaróz géleket használtunk /gyors tesztekhez 0.6x8; 0.6 x 10 cm-es csöveket/ csöves ill. lemez elektroforézis körülményei között. Rövid időtartamu futásoknál a gélek 0.5 µg/ml ethidium-bromidot tartalmaztak, hosszú időtartamu futásoknál a festést a futtatás befejezése után végeztük. A géleket lényegében Helling et. al. /80/ szerint készítettük. A tartálpuffer összetétele a következő volt: 50mM Tris.acetát /pH 8.3/, 20mM Na-acetát, 2mM EDTA, 18mM NaCl. Az elektroforézist gyors futtatások esetén rövid csövekben 8-10mA / cső , hosszabb csövekben 3mA / 5V /cső ill. lemezgél esetén 80 V/ 60mA mellett végeztük.

c/. Az egyes szálu DNS fragmentek analiziséhez 4%-os, 7M ureát tartalmazó akrilamid géleket használtunk. A gélek készítését, a minták előkezelését / denaturálását/ és elektroforézisét lényegében Maxam, Gilbert /59/ szerint végeztük.
/ 30 V/ 5mA, 12 óra/

III. Az RNS minták elektroforézisét 2.25% akrilamidot, 0,5% agarózt tartalmazó géleken végeztük 0.02% SDS jelenlétében, 40mM Tris.HCl /pH 7.2/, 20mM Na-acetát, 1mM EDTA, 0.02% SDS pufferben.

Autoradiográfia, radioaktivitásmérés

Ha radioaktív nukleinsav mintákat futtattunk, a géleket futás után vákuumpumpával megszárítottuk vékony műanyag fóliába csomagolva, majd a filmeket / X-ray film, Forte, Agfa, Kodak/ a felvitt aktivitástól függően 2-48 óráig ill. 1-2 hétig exponáltuk. A $/H^3/$ tartalmu minták autofluorográfiáját /81/ szerint végeztük.

A $/P^{32}/$ -jelzett minták aktivitását vizes kivettában, a $/C^{14}/$, $/H^3/$ -jelzett minták aktivitását toluolos elegyben / 4g PPO, 0.05g POPOP / 1 liter toluol/ mértük Beckman LS200, Packard, Nuclear Chicago ill. LKB Liquid scintillációs számlálókon. / A $/P^{32}/$ -jelzett minták radioaktivitását vizes kivettában, Cserepov sugárzás alapján mértük./

Endonukleáz aktivitás mérése az enzimtisztítások során

Az enzimtisztítások során az egyes frakciók aktivitását csapadék teszttel / clot teszt //Smith, 42/ határoztuk meg.

1-20 μ l enzimet / titráláskor az enzim hígítási sor tagjaiból/ mértünk 100 μ l TSM / 10mM Tris.HCl /pH 7.5/, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$ /. A reakciót 20 μ l borjú timusz DNS /1.5 mg/ml/ adásával indítottuk. Az elegyet 20 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd 50 μ l 0.3%-os BSA-val és 200 μ l 10%-os hideg TCA-val leállítottuk. Rövid ideig állni hagytuk, majd újra összerázva értékeltük.

Az enzimaktivitás egysége az az enzimmennyiség, amely még pozitív reakciót / apró, finom eloszlásu csapadékot / ad.

/clot E/

A csapadék teszttel mért aktivitások helyét / az egyes frakciókban/ és mennyiségét λ DNS emésztést követő gélelektroforézissel ellenőriztük. 1 μ g λ DNS-t emésztettünk Bsp-pufferben az enzim higitási sorozat tagjaival 37°C-on, 1 óráig, majd a reakciókat leállítottuk. A reakcióelegyeket 0.7-1.0%-os agaróz vagy 4%-os akrilamid géleken elektroforetizáltuk. Az aktivitás egysége az az enzimmennyiség, amely 1 óra alatt 37°C-on 1 μ g λ DNS-t teljesen megemészt. / λ E/

1 clot egység megfelel 5 λ egységnek. Ezáltal, bár a clot teszt aspecifikus, alkalmas a tisztítások során az enzim mennyiségi mérésére, jó közelítéssel.

Az R.BspRI aktivitás optimumkörülményeinek, továbbá az egyes ionok hatásának vizsgálatakor olyan enzimmennyiséggel emésztettünk, amely csak az optimális körülmények között okozott teljes vagy a teljeshez közel álló emésztést. Az enzimaktivitást befolyásoló tényezők /pH, ionerősség stb./ optimalistól való eltérése vagy gátlóanyagok hatása a gélképen a nagymólsúlyú részleges emésztési termékek /sávok/ megszaporodásában, esetleg az emésztés hiányában nyilvánul meg.

Exonukleázok mérése

Az enzimpreatarátumok exonukleáz szennyezésének meghatározására a tesztek a restrikciós emésztés körülményei között, a radioaktív DNS-ből felszabaduló savoldható emésztési termékek mérése által végeztük.

Szubsztrátként /P³²/ λ DNS-t használtunk / spec. a. 56.000

cpm/ μ g /, melyet növekvő mennyiségű, nagy fölöslegű enzimmel inkubáltunk 37°C-on, 7 óráig, 100 μ l térfogatban. A reakciót 200 μ l 1.5 mg/ml borju timusz DNS adása után, 500 μ l 10%-os TCA-val állítottuk le. 0°C-on 30 perc precipitálódás után a csapadékot centrifugáltuk / 2.500 rpm, 30 perc, Janetsky K23/, a szupernatans aktivitását mértük Beckman LS200 folyadék szcintillációs számlálón. / A mért értékeket korrigáltuk, figyelembe véve a TCA kioldó / quenchelő/ hatását.

RN-áz aktivitás mérése

A minták RN-áz szennyezettségének mértékét az exonukleáz méréshez hasonló alapelven határoztuk meg. Növekvő feleslegű enzimmel teszteltük az egyes szálu ill. kétszálu RNS-re specifikus RN-ázok jelenlétét /P³²/-jelzett 23S rRNS /spec. a. 380.000 cpm/ μ g/ ill. /P³²/ Sindbis virus RF RNS felhasználásával.

Fehérjék mérése

A minták fehérjetartalmának meghatározását Lowry és mtsi. /82/ szerint végeztük.

A metiláz aktivitás mérése, követése a tisztítások során

A metiláz aktivitás két módszerrel is mérhető, de nem azonos hatásokkal. A kvalitatív méréshez áll közelebb a

1/. védési teszt. - A helyspecifikus metilálás megvédi a DNS-t az azt követő restrikciós emésztéssel szemben.

A Bsp-metiláz puffer / 20mM Tris.HCl /pH 7.5/, 50mM NaCl, 10mM EDTA / mellett a reakcióelegy 1 μg λ DNS-t, 10-100 μM SAM-t, és különböző mennyiségű metilázot tartalmazott. A reakcióelegyet 3-5 óráig inkubáltuk 37 °C-on, majd kiegészítettük Mg^{2+} -mal / 20mM végkoncentrációig/ és R.BspRI endonukleázt /5 λ E/ adtunk hozzá. További 1 óra inkubálás után a reakciót leállítottuk, az elegyet elektroforetizáltuk.

Enzimegységként az 1 μg λ DNS-t 3 óra alatt, 37°C-on megvédő metiláz mennyiségét definiáltuk. /metE/

2/. Metil-csoport beépítési teszt

A teszt alkalmas a metilálás kvantitatív mérésére. A jelzett metil-csoport beépítési reakció során az időegység alatt beépülő metil-csoportok mennyiségét határozzuk meg. A metiláló reakcióelegy 5-10 μM S-adenozil-L-/H³metil/-metionint tartalmazott. Enzimegységként /U/ azt a metiláz mennyiséget definiáltuk, amely 1 óra alatt, 37°C-on 1 pmól metil-csoportot épít a DNS-be.

A reakcióelegy aliquotjait DE 81 /Whatman/ filterre száritottuk, majd a filtereket 30 percig, rázogató mellett 20 ml Na_2HPO_4 /pH 7.5/ pufferben áztattuk jégen, ezt követően 2x5 ml ugyanilyen pufferrel, 2x5 ml 96%-os jéghideg etanollal és 5 ml etil-éterrel mostuk. Száritás után toluolos elegyben, LKB szcintillációs számlálón mértük a filter-kötött aktivitást.

/ A DE 81 papír adszorbeálja a DNS-t/.

A metilálási reakciót telítésig végezve / az összes felis-

merőhely metilálódásáig/ jelzett SAM-nal, meghatározható a felismerőhelyek száma bármely DNS-en. λ cI857S7 DNS-en a felismerőhelyek számának meghatározásához 100 μg λ DNS-t, 100 μl metilázt /DNS.agaróz frakció/, 5 μM / C^{14} /SAM-t mértünk a metiláz puffert tartalmazó reakcióelegybe. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk, időnként 20 μl -es aliquotokat vettünk, meghatároztuk a beépült metil-csoportok pmóljainak számát, pmól szubsztrátra vonatkoztatva. Miután további beépülést nem észleltünk, erről ismételt SAM ill. enzim adásával és védési teszttel meggyőződünk, a reakcióelegyet fenoloztuk, 10mM Tris.HCl /pH 8.0/, 1mM EDTA pufferrel szemben dializáltuk. A felismerőhelyek számát a telítési beépülés értékéből meghatároztuk.

/ C^{14} /metilált DNS bázisanalizise

A / C^{14} / metilált λ DNS-t /50 μg / szárazra pároltuk, 0.5 ml 98%-os hangyasavval bombacsőbe mostuk, a csövet lezárva, 175 °C-on, 30 percig hidrolizáltuk 1 mg csirke vvt. DNS-sel együtt. A hidrolizátumot a hangyasav elpárologtatása után 50 μl 1N HCl-ban feloldottuk, majd Fixion 50-X8 kationcserélő vékonyrétegen 2.8N HCl-ban 5 óráig kromatografáltuk. / Tomasz J., 83 szerint/ Kontrollként adenin, guanin, timin, citozin, 5-metil-citozin bázisok 5 mg/ml-es oldataiból 5-10 μl -t vittünk fel. A lemezeket szárítás után autoradiografáltuk, a C^{14}H_3 -jelölt bázist azonosítottuk.

Fehérjék molekulaszúlyának meghatározása gélfiltrációval

A tisztított R.BspRI és M.BspRI enzimeket Sephadex G-150 /1.8x50 cm/ oszlopon kromatografáltuk 50mM Tris.HCl /pH 7.5/, 0.1M KCl, 7mM 2-merkaptoetanol pufferrel. Az oszlopot Blue dextrán 200-zal /Pharmacia/ /ill. kálium-bikromáttal/ kalibráltuk. Sertés laktát-dehidrogenázt /LDH/, E. coli alkalikus foszfatázt /AF/, izom cytochróm C-t használtunk mólsúlymarkekként. /Molekulaszúlyaik sorrendben 142.000, 86.000, 11.700/ 1 ml térfogatban 75 U LDH, 50 E alkalikus foszfatáz, 6000 λ E R.BspRI, 175 U M.BspRI és 5 mg cytochróm C elegyét rétegeztük az oszlopra, majd 15 ml/óra átfolyással eluáltuk.

Az LDH és alkalikus foszfatáz aktivitásokat /84, 85/ szerint, a cytochróm C-t 412 nm-es abszorpciója alapján, az R.BspRI-et λ emésztési teszttel, az M.BspRI-et metil-csoport beépítési és védési teszttel követtük. / A metiláz reakcióelegyeket 0.01% BSA-val kiegészítettük, mindkét teszt esetén az inkubálási idő 3 óra volt, 37°C-on./

III. Eredmények értékelése és megvitatása

1/. Az R.BspRI restrikciós-modifikációs rendszer része

Az R.BspRI a II. típusu restrikciós endonukleázokra jellemző specifikus fragmentációt mutat ϕ X 174 RF, λ DNS-eken. Felismerőhelyének szekvenciája 5' G-G-C-C 3'. Ezt alátámasztja a BsuRI-el végzett kettős emésztés gélképe is. Az R.BspRI a HaeIII, BsuRI, BlnII, FnuDI, Pali, HhgI, SfaI isoschizomerje.

Arra, hogy az R.BspRI restrikciós endonukleáz ill. restrikciós-modifikációs rendszer része közvetlen bizonyíték nem volt. A kérdés eldöntése szempontjából döntő, hogy az R.BspRI hasítja-e a specifikus modifikációval rendelkező szubsztrátot, a saját DNS-t.

Bacillus sphaericus R DNS-t R.BspRI-el prolongáltan emésztve a gélképen fragmentációt nem észleltünk. Ugyanezt az eredményt kaptuk a BspR törzsből izolált plazmid ill. in vitro M.BspRI-el metilált λ c1857, ϕ X 174 DNS-ek emésztése során. Ezek az eredmények egyértelműen igazolják az R.BspRI restrikciós endonukleáz voltát.

2/. Az R.BspRI tisztítása

A tisztítás menete a foszfo-cellulóz kromatográfiás lépésig megegyezik a korábbi eljárással. /62/ Számos tisztítás során további kromatográfiás lépéseket iktattunk be, próbáltuk ki azok kombinációit, ellenőriztük reprodukálhatóságukat, amíg a jelenlegi eljárással sikerült az R.BspRI-et homogén

formában kinyerni. / A preparálás menetét az I. táblázat mutatja./ Az összes műveletet $0-4^{\circ}\text{C}$ között végeztük.

I. Feltárás, ultrahangozás

A fermentált, lefagyasztott sejtmasszát / 40 g/ 15 g-os tételekben 4°C -ra melegítettük, 15 ml 20mM Tris.HCl /pH 8.0/, 14mM 2-merkaptotanol, 0.1mM EDTA pufferben felszuszpendáltuk. / Biogél $A_{0.5\text{m}}$ oszlopunk mérete miatt 15 g-nál nagyobb tételekből nem volt célszerű kiindulni./ A sejtszuszpenziót só-jég hűtés mellett ultrahangoztuk /MSE ultrahangozó/, amíg az OD_{550} értéke az eredeti 10-15%-ára nem csökkent /15x30 sec/. A feltárás után a sejttörmelékét centrifugáltuk / Beckman 50.1 rotor, 30.000 rpm, 1 óra, 4°C /.

II. Nukleinsavmentesítés

A felüluszót NaCl-dal 1 M-ig telítettük. Ezután 20mM Tris.HCl /pH 8.0/, 14mM 2-merkaptotanol, 0.1mM EDTA, 1M NaCl pufferrel ekvilibrált Biogél $A_{0.5\text{m}}$ /2.5x 75 cm/ oszlopra vittük. /40 ml/óra/ Ugyanolyan pufferrel eluáltuk /60 ml/óra/, 6-8 ml-es frakciókat szedve. A frakciókból endonukleáz és metiláz meghatározást végeztünk. / A Biogél frakciók az R.BspRI mellett a teljes metiláz aktivitást is tartalmazzák./ Nukleinsavmentesítés után az egyes sejtfeltárásokból származó aktiv frakciókat egyesítettük.

III. Ammónium-szulfát frakcionálás

Az előkísérletek során megállapítottuk, hogy milyen

$\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ koncentráció mellett sózódik ki az R.BspRI és az M.BspRI. Az I. és II. ábra mutatja egy ilyen kísérlet eredményét, azt, hogy az endonukleáz döntő többsége 40-60% telítettség között sózódik ki, a teljes metiláz aktivitással együtt.

A kisózást 0°C -on végeztük állandó, lassu kevertetés mellett. / 30-60 perc/ Az oldat pH-ját tömény NH_4OH -dal állítottuk neutrálisra, ha szükséges volt. Magas $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ koncentrációknál az enzim gyorsan inaktiválódik oldatban, csapadék formájában viszont stabil.

A Biogél frakciót először 40%-ig telítettük ammónium-szulfáttal, majd a kivált csapadékot centrifugáltuk. / Beckman J-21 centrifuga, JA-20 rotor, 18.000 rpm, 20 perc, 2°C / A felüluszóhoz további ammónium-szulfátot adtunk, 60%-os telítésig, majd ismét centrifugáltuk. / 40 perc/ A kivált csapadékot PC-pufferben /10mM K-foszfát /pH 7.5/, 7mM 2-merkaptoetanol, 0.1mM EDTA / feloldottuk és ugyanezzel a pufferrel szemben dializáltuk / 200-szoros kültér, háromszori puffercserre/, amíg vezetőképessége 2-4 mS-re nem csökkent.

IV. Foszfocellulóz kromatográfia /P₁₁/

Az ammónium-szulfátos frakciót előzőleg PC-pufferrel ekvilibrált foszfocellulóz oszlopra /1.7x23 cm/ vittük. /5 ml/óra/ Az oszlopot 5-szörös oszloptérfogatnyi pufferrel mostuk / 20 ml/óra/, majd 1000 ml 0-0.7M KCl gradienssel eluáltuk 3-4 ml-es frakciókat szedve.

A foszfocellulóz oszlopra felvitt endonukleáz aktivitás 4%-a, a metiláz nagy többsége nem kötődött meg. Az R.BspRI

I. ábra Az R.BspRI ammónium-szulfát frakcionálása

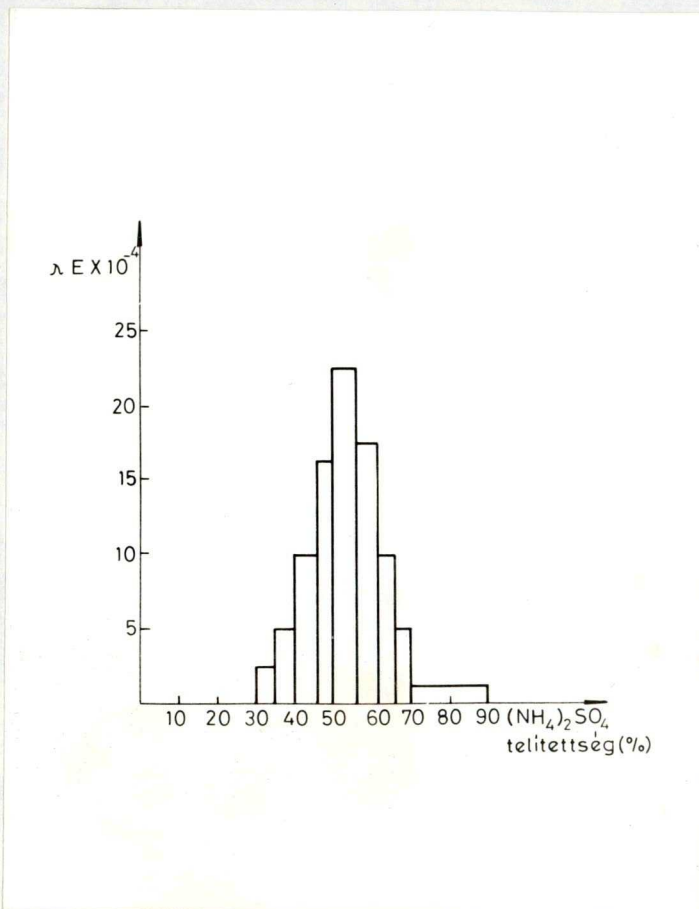
Az R.BspRI Biogél frakciót /dializálás nélkül, 1M NaCl mellett/ telítettük 10, 20.5, 31, 41, 46, 51, 56, 62, 67, 71, 92% telítettséig ammónium-szulfáttal. Az egyes telítési lépcsők csapadékait PC-pufferrel szemben dializáltuk, az enzimaktivitást csapadék teszttel határoztuk meg.

II. ábra Az M.BspRI ammónium-szulfát frakcionálása

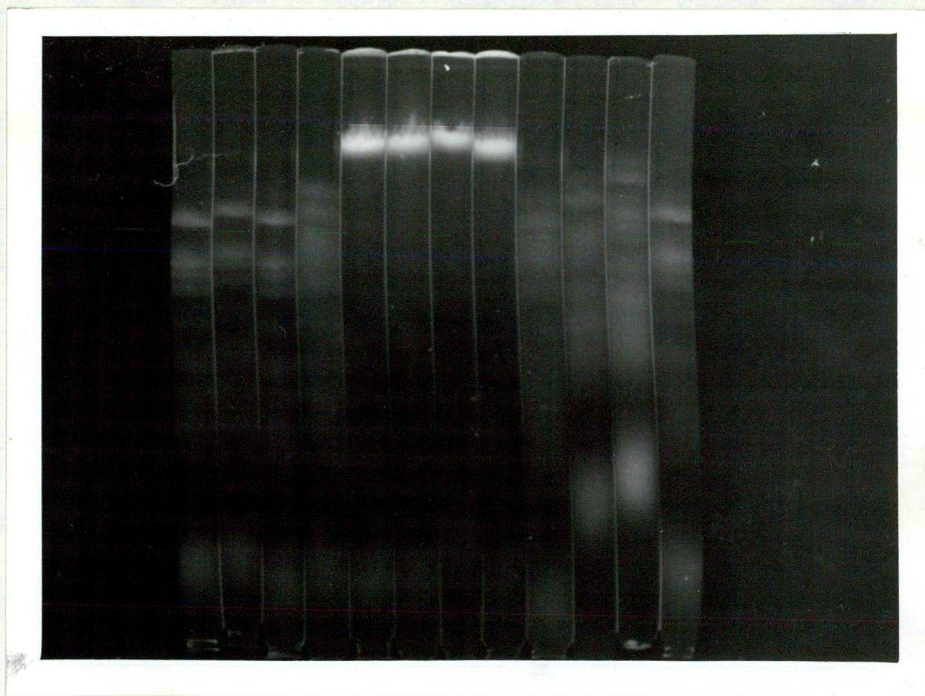
Az R.BspRI ammónium-szulfát telítési lépcsők csapadékait védési teszttel vizsgáltuk metilázra. Az ábra metiláz aktivitást mutat 46-62% telítettségi tartományban. Egyéb értékeknél a védési teszt negatív.

A gélek sorrendben a következő ammónium-szulfát telítések csapadékaiból végzett védési tesztek mutatják: 1/. 10%, 2/. 21%, 3/. 31%, 4/. 41%, 5/. 46%, 6/. 51%, 7/. 56%, 8/. 62%, 9/. 67%, 10/. 71%, 11/. 92%, 12/. 100% . / Az I. és II. ábrán feltüntetett enzimaktivitás adatok a megadott $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ telítési lépcsők között kisózódó enzimmennyiségeket jelölik./

190-310mM KCl között eluálódik /120 ml/, a visszanyerés 60-65%-os. A foszfocellulóz oszlopon az endonukleáz aktivitás gyakorlatilag teljesen elkülöníthető a szennyező exonukleázoktól. Nem kellő oszlop ill. gradiensméret választása esetén az exonukleáz szennyezés mértéke elérheti az 1-2%-ot is.



I. ábra Az R.BspRI ammónium-szulfát frakcionálása



II. ábra Az M.BspRI ammónium-szulfát frakcionálása



Az oszlopon megkötődő metiláz továbbra is együtt tisztul az R.BspRI-el. Ezért a metiláz tisztítása előtt ezt a frakciót használtuk az in vitro metilálási kísérletekben. / A tisztításban a foszfo-cellulóz kationcserélő oszlop bizonyos szempontból affinitáskromatográfiának is tekinthető, mivel a DNS-hez specifikusan kötődő fehérjék legtöbbször megkötődnek./

V. Hidroxilapatit kromatográfia /HA/

A IV-es frakciót /120 ml/ 20mM K-foszfát /pH 7.5/, 7mM 2-merkaptoetanol, 0.1mM EDTA, 0.1M KCl pufferrel szemben dializáltuk, majd előzőleg ugyanilyen pufferrel ekvilibrált hidroxilapatit oszlopra /1.6x10 cm/ vittük / 5 ml/óra/. Az oszlopot 5-8-szoros térfogatnyi 50mM K-foszfát /pH 7.5/, 7mM 2-merkaptoetanol, 0.1mM EDTA pufferrel mostuk, majd 7mM 2-merkaptoetanol és 0.1mM EDTA-t tartalmazó 50-300mM K-foszfát /pH 7.5/ gradienssel /500 ml/ elűztük. Az endonukleáz aktivitás 80-120mM KH_2PO_4 között jött le, a felvitt aktivitás 65-70%-át nyertük vissza. A metiláz szennyezés itt is megtalálható az endonukleáz mellett.

Az aktív frakciókat DNS.agaróz puffer /10mM Tris.HCl /pH 8.0/, 50mM KCl, 1mM EDTA/ 20-szoros térfogatával szemben dializáltuk.

VI. DNS.agaróz affinitáskromatográfia /DNS.a/

Az egyszáru /denaturált/ DNS-t tartalmazó DNS.agaróz mátrixot /75/ szerint készítettük. Az V. frakciót / 80 ml/ 5 ml/

óra sebességgel vittük az oszlopra / 1.5x10 cm/, majd legalább tízszeres oszloptérfogatnyi pufferrel mostuk. 500 ml 50-500mM KCl lineáris gradienssel eluáltuk, 3 ml-es frakciókat szedve. / 20 ml/óra/. Az R.BspRI aktivitás éles csúsként eluálódott 230-300mM KCl tartományban. 0.3M KCl alatt metiláz aktivitást mérni nem tudtunk, ami jelezte, hogy a DNS.agaróz elválasztja az endonukleáz és metiláz aktivitást egymástól.

Az oszlopról az endonukleáz visszanyerése 80-90%-os volt. Az aktív frakciókat / 80 ml/ 55% glicerint tartalmazó PC-pufferrel szembeni dialízissel töményítettük és - 20°C-on tároljuk. A DNS.agaróz frakció homogén R.BspRI-et tartalmaz. /ld. később/

A tisztítás korábbi változataiban a DNS.agaróz oszlopot alkalmaztuk az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ frakcionálási lépés ill. közvetlenül a foszfocellulóz kromatográfia után. Korai lépésekben a DNS.agaróz nem alkalmas az exonukleáztól való elválasztásra.

A foszfocellulóz kromatográfiát követő lépésként küzel homogén enzim nyerhető, mely exonukleáz mentes, nem tartalmaz egyes ill. kettős szálú RNS specifikus ribonukleázt.

3/. Az M.BspRI tisztítása

Az R.BspRI tisztítások során nyert tapasztalatok alapján próbáltunk az endonukleázhoz hasonló hatásos tisztítási eljárást kidolgozni az M.BspRI-re.

Az M.BspRI a foszfocellulózos lépésig együtt tisztul az

endonukleázzal, a foszfocellulóz kromatográfia során /pH 7.5-nél/ a metiláz aktivitás kb. 90%-a nem kötődik az oszlopon.

a/. A metiláz tisztítás első változatában a foszfocellulóz oszlopon átfolyt M.BspRI frakciót tisztítottuk, a következő lépések során, tovább. Az enzimaktivitást a tisztítás folyamán védési teszttel követtük.

I. CM-cellulóz kromatográfia

10mM K-foszfát /pH 7.0/, 1mM EDTA, 7mM 2-merkaptóetanol, 50mM NaCl pufferrel ekvibrált CM-cellulóz oszlopon a teljes metiláz aktivitás átfolyik. Tisztítási lépésként való alkalmazása maximum 2-3-szoros tisztulást eredményez.

II. Hidroxilapatit kromatográfia

Az I. frakciót /83 ml/ 20mM K-foszfát /pH 7.5/, 7mM 2-merkaptóetanol, 0.1M KCl pufferrel szemben dializáltuk, majd ugyanezzel a pufferrel ekvibrált /2.2x13.5 cm/ hidroxilapatit oszlopra vittük. Az oszlopot 25mM K-foszfát /pH 7.5/, 7mM 2-merkaptóetanol, 0.1mM EDTA pufferrel mostuk / tízszeres oszloptérfogat/, majd 500 ml 20-500mM K-foszfát /pH 7.5, 7mM 2-merkaptóetanol, 0.1mM EDTA / gradienssel eluáltuk. A felvitt aktivitás 80-90%-át nyertük vissza, a metiláz 45-160mM KH_2PO_4 között mosódott le az oszlopról.

III. DEAE-cellulóz kromatográfia

A 2x13 cm-es DE 52 oszlopot 10mM K-foszfát /pH 7.5/, 7mM 2-merkaptóetanol, 0.1mM EDTA pufferrel ekvibráltuk. A diali-

zált /105 ml/ II. frakciót felvitel után /10 ml/óra/ három oszloptérfogatnyi pufferrel mostuk. / 20 ml/óra/ Ezt követően, 1000 ml 0-1.0M KCl gradienssel mosva az oszlopot, a felvitt metiláz aktivitás 45-50%-a eluálódott 180-270mM KCl között. Az összegyűjtött aktív frakciókat DNS.agaróz pufferrel szemben dializáltuk /92 ml/.

IV. DNS.agaróz kromatográfia

A kromatográfiát /1.6x13 cm-es/ oszlopon végeztük a restrikiós endonukleázéhoz hasonló körülmények között. Az oszlopot, felvitel után, 5-szörös oszloptérfogatnyi pufferrel mostuk, majd 500 ml 0.05-1.0M KCl gradienssel eluáltuk 2.5 ml-es frakciókat szedve. A metiláz aktivitás töredék része eluálódott 420-475 mM KCl között, éles csucs formájában.

b/. A metiláz tisztítás második változata lépéseiben megegyezik a restrikiós endonukleázra leírt tisztítási eljárással. A tisztítás során a metiláz aktivitást védési és metil-csoport beépítési teszttel követtük.

I.-III. 25-30g sejt ultrahangos feltárása után a nyers lisátumot ultracentrifugáltuk. /100.000g/ A felülusztót, nukleinsavmentesítés után / 1M NaCl, Biogél A_{0.5m}/ 42%, majd 62%-ig telítettük /NH₄/₂SO₄-tal. A 62%-os telítés csapadékát PC-pufferrel szemben dializáltuk. / Az első három lépés tisztítási hatásfoka megegyező az I. táblázat adataival./

IV. Foszfocellulóz kromatográfia

A foszfozellulóz kromatográfia körülményeinek csekély megváltoztatásával /pH 7.2/ sikerült a metiláz aktivitás 65-70%-át az oszlopon / 2x19 cm/ megkötni. Az enzimet 1500ml 0-1.0M KCl gradienssel eluáltuk. A metiláz aktivitás 210-330mM között, széles csucsként eluálódott. Az oszlopról a felvitt aktivitás 30-35%-át nyertük vissza.

V. Hidroxilapatit kromatográfia

A HA-pufferrel szemben dializált IV. frakciót 1.8x12.5 cm-es hidroxilapatit oszlopra vittük. Mosás után az enzim a 40-300 mM K-foszfát /pH 7.5, 7mM 2-merkaptoetanol, 0.1mM EDTA/ gradiensen 70-130mM K-foszfáttal eluálódott. / Az oszlopról 52-55% hatásokkal nyertük vissza az enzimet./

VI. DNS.agaróz kromatográfia

Az V. frakciót 10mM Tris.HCl /pH 8.0/, 50mM KCl, 7mM 2-merkaptoetanol pufferrel ekvilibrált DNS.agaróz oszlopra /1.5x12 cm/ vittük. Intenzív mosás után az enzimet 0.05-1.0M KCl gradienssel eluáltuk. A restriksiós endonukleáz 200-270mM, a metiláz 320-380 mM KCl között eluálódott. A felvitt metiláz aktivitásnak csupán 8%-át nyertük vissza. / Bár a tisztítás folyamán a metiláz aktivitást követtük, az affinitáskromatográfia után közel homogén endonukleáz preparátumot nyertünk./

A DNS.agaróz metiláz frakciókat 55%-os glicerines PC-pufferrel töményítettük, -20°C-on tároltuk. A metiláz aktivitása több, mint 8 hónapon át nem csökkent -20°C-on.

Jelenleg a metiláz irreverzibilis aktivitásvesztését, a DNS.agaróz kromatográfia során, magyarázni nem tudjuk. / Feltehetően azonban, hogy a tisztításnak ebben a stádiumában kevésbé stabil, hatásosabb védelmet /magasabb 2-merkaptoetanol koncentráció, BSA vagy glicerin/ igényel./

I. táblázat Az R.BspRI tisztítása

Frakció	Teljes fehérje /mg/	spec. aktivitás / μ E/mg/	Vissza- nyerés / % /	Tisztulás
I. crude	6854	4780	100	1
II. Biogél				
Δ 0.5m	2443	10625	79	2.2
III. /NH ₄ / ₂ SO ₄	657.2	18645	37	4.0
IV. Foszfocellulóz	67.2	111600	23	23.5
V. Hidroxilapatit	6.22	852400	16	178
VI. DNS.agaróz	0.416	10576900	13.4	2210

II. táblázat Ag M.BspRI tisztítása / a/. változat/

Frakció	Teljes fehérje /mg/	spec. aktivitás /metE/mg/	Vissza- nyerés / % /	Tisztulás
I. Foszfo- cellulóz	751.5	266	100	1
II. CM- cellulóz	466.3	429	99	1.8
III. Hidroxil- apatit	161.7	1307	98	4.9
IV. DEAB- cellulóz	54.46	1689	46	6.3
V. DNS.agaróz	0.05	160000	4	600

III. táblázat Ag M.BspRI tisztítása / b/. változat/

Frakció	Teljes fehérje /mg/	spec. aktivitás / U/mg/	Vissza- nyerés / % /	Tisztulás
I. nyers kivonat	2685	146	100	1
IV. Foszfo- cellulóz	19.5	3510	17	24
V. Hidroxil- apatit	4.18	8600	9	59
VI. DNS.agaróz	~ 0.02	~ 123700	~ 0.6	~ 850

4/. Az R.BspRI és M.BspRI elektroforetikus analizise

a/. Az R.BspRI nativ fehérjeelektroforézise

Az enzim nativ fehérjeelektroforézisét a tisztítás DNS. agaróz frakciójával végeztük. A riboflavinnal polimerizált 7.5%-os akrilamid géltre a mintákat 5%-os gélbe polimerizálva vittük fel, 4°C-on 80-100V/ 20-40mA-rel, 6-7 órán át elektroforetizáltuk.

Az R.BspRI restrikciós endonukleáz egyetlen fehérjesávként festődött a géleken.

b/. Az R.BspRI SDS-elektroforézise, mólsúlyának meghatározása

A restrikciós endonukleáz homogenitásának igazolására /RNS-polimeráz és cytochróm C mólsúlymarkerek mellett/ 30 ill. 20 µg R.BspRI-et elektroforetizáltunk csövenként. Az SDS-gélképen az enzim egyetlen, az RNS-polimeráz α alegységénél valamivel nagyobb mobilitású fehérjesávot adott. Az R.BspRI fehérjesávjának megfelelő abszorpciós görbét a 3. ábra, a gélképet a 4. ábra mutatja. /Az R.BspRI mólsúlymeghatározását, az erre alkalmasabb, lemezgélen végeztük /7.2%/ . 16 µg R.BspRI-et vittünk a géltre, egy éjszakán át 40V/40mA mellett futtattuk./

Az RNS-polimeráz α alegységének / a teljes aminosavszekvenciából megállapított / mólsúlya, a korábban elfogadott 44.000 dalton helyett, 36.500./86/ Az enzim log mólsúly-mobilitás diagramról leolvasott mólsúlya, ennek alapján, denaturáló körülmények között 30.000 dalton.

Az R.BspRI elektroforetikus tisztasága legalább 96%.

Az enzim alegyszerkezetének vizsgálata céljából mólsúlyát Sephadex G-150 gélfiltrációval / E. coli alkalikus foszfatáz, laktát-dehidrogenáz, cytochróm C mólsúlymarkerrel / is meghatároztuk. Figyelembe véve az így kapott 36.000 dalton értéket, valószínű, hogy az aktiv enzim egyetlen polipeptid láncból áll. A K_d -log mólsúly görbét a 6. ábra mutatja.

Koncentrációfüggő dimer ill. tetramerképződés igazolására nem rendelkezünk adatokkal, így nem zárható ki, hogy az aktiv enzim in vivo, az EcoRI-hez hasonlóan dimer ill. tetramer strukturájú /45/. A Sephadex gélfiltráció adatait tekintve azonban, az aktiv enzim nagy valószínűséggel monomer.

Az R.BspRI hidroxilapatit frakciója a restrikciós endonukleáz mellett szennyezésként, közel hasonló mennyiségben, egy 52.000 dalton mólsúlyu fehérjét tartalmaz. /4. ábra/

3/. ábra Az R.BspRI SDS-elektroforézise

30 μ g R.BspRI-et /DNS.a frakció/ elektroforetizáltunk denaturáló körülmények között, 0.1% SDS-t tartalmazó 7.2%-os akrilamid gélen. /0.6x15 cm-es csövek, 60V/50mA, 6 óra/ az enzim homogenitásának igazolása céljából. Az ábra a gél denzitometriás görbét mutatja. / Gilford spektrofotométeren, 550nm-nél, gélscan kiiró feltétellel./

4/. ábra Az R.BspRI és M.BspRI SDS-gélelektroforézise

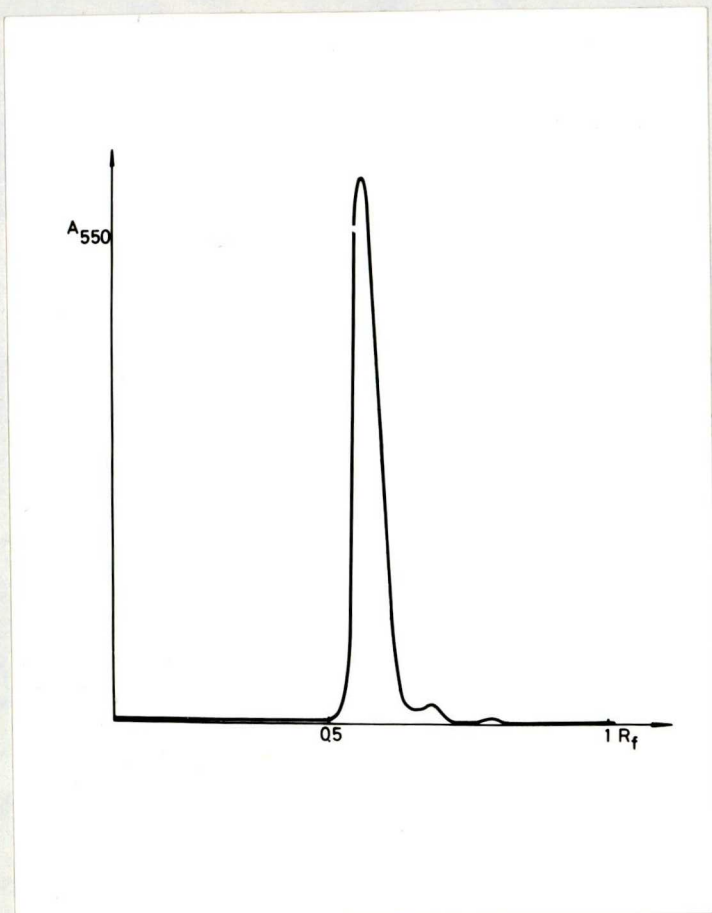
Az ábra az R.BspRI tisztítás DNS.agaróz és hidroxilapatit, az M.BspRI tisztítás /a/. változat/ DNS.agaróz frakciójának SDS-elektroforézissel nyert képeit mutatja E. coli RNS-polimeráz és cytochróm C mólsúlymarkerek mellett 7.2%-os akrilamid-/0.1%/ SDS géleken. / Az elektroforézist 0.6x15 cm-es csövekben, 40V/30mA-nél, 12 órán át végeztük./ RNS-polimeráz /I/, M.BspRI /DNS.a frakció//II/, R.BspRI /hidroxilapatit frakció//III//, R.BspRI /DNS.a frakció//IV/, cytochróm C /V./

5/. ábra Az R.BspRI mólsúlyának meghatározása

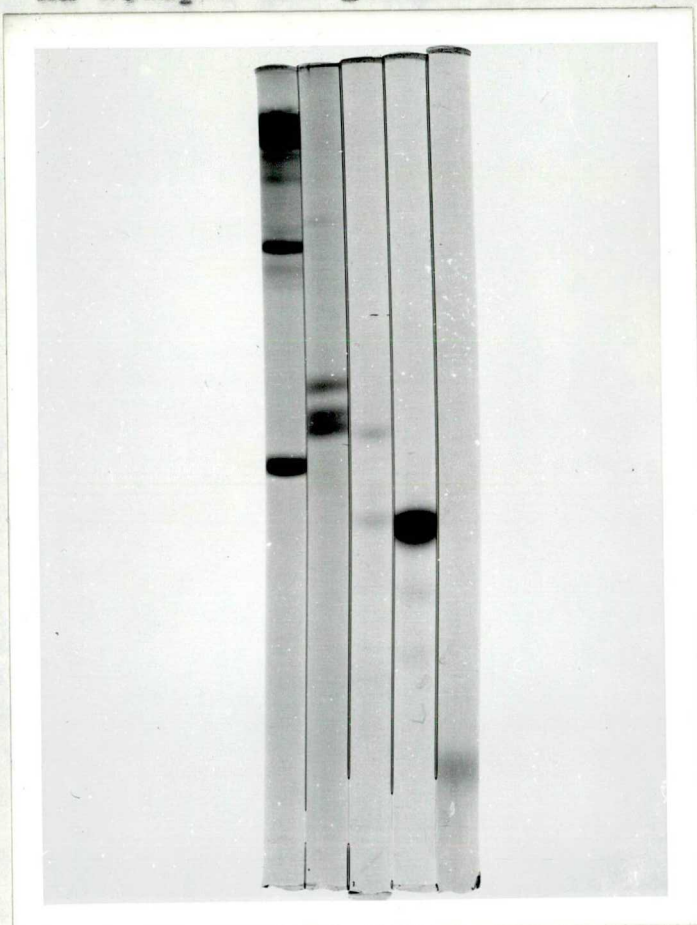
Az ábra az R.BspRI ill. M.BspRI log mólsúly-mobilitás diagramját mutatja. / Az ábrán az R.BspRI DNS.agaróz ill. hidroxilapatit, az M.BspRI tisztítás /a/. változat/ DNS.agaróz frakciójában lévő fehérjéknek megfelelő mólsúlyokat tüntettük fel, a mólsúlymarkerek mellett. /RNS-polimeráz β /165.000/, β' /155.000/, ζ /95.000/, α /36.500/ ill. cytochróm C /11.700// Az alsó nyilak az M.BspRI /DNS.a/, a felsők az R.BspRI /HA ill. DNS.a/ frakcióiban lévő fehérjék mólsúlyait jelölik.

6/. ábra Az R.BspRI és M.BspRI mólsúlyának meghatározása Sephadex G-150 gélfiltrációval

Az ábra a K_d - log mólsúly diagramot mutatja. A gélfiltráció során markerként használt fehérjék mólsúlyai a következők: E. coli alkalikus foszfatáz /AF/ 86.000/, laktát-dehidrogenáz /sertés//LDH/ 142.000, cytochróm C 11.700.

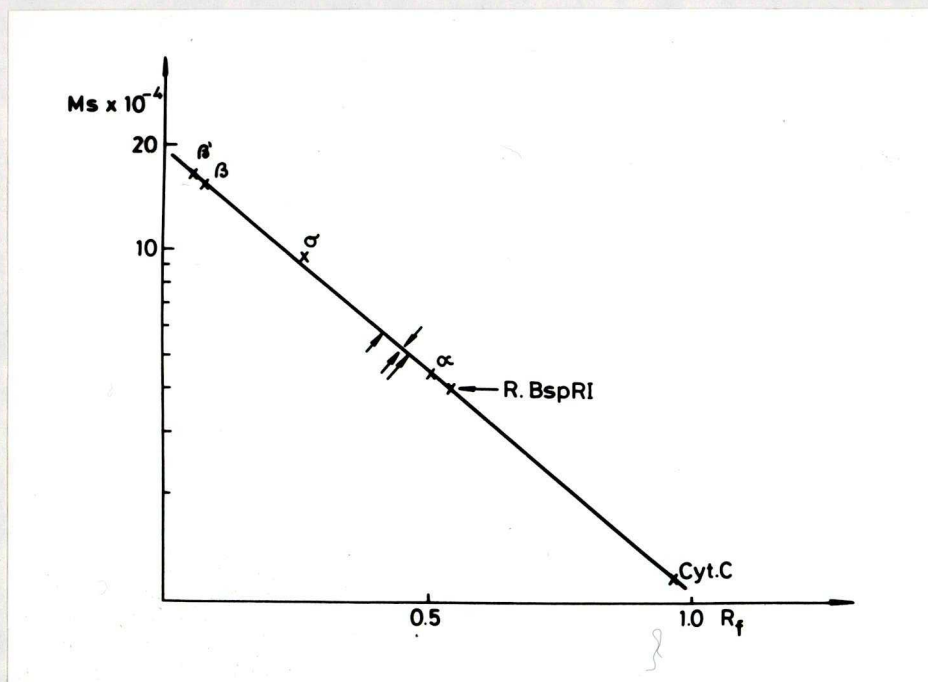


3/. ábra Az R.BspRI SDS-gélelektroforézise

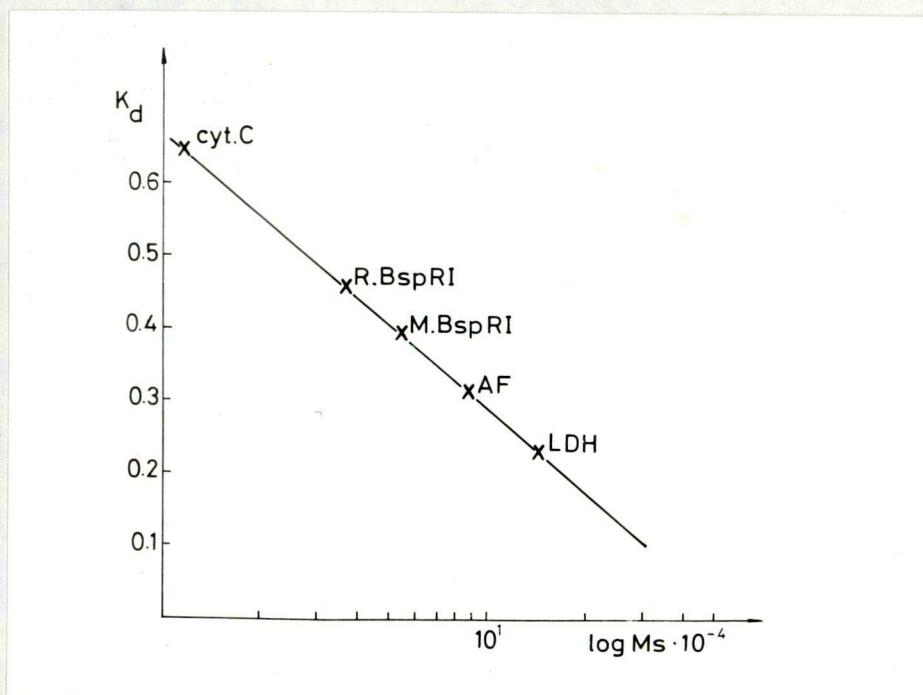


4/. ábra Az R.BspRI és M.BspRI SDS-gélelektroforézise





5/. ábra Az R.BspRI mólsúlyának meghatározása



6/. ábra Az R.BspRI és M.BspRI mólsúlyának meghatározása
Sephadex G-150 gélfiltrációval

c/. Az M.BspRI SDS-gélelektroforézise, mólsúlyának meghatározása

Az M.BspRI tisztítás első változatának DNS.agaróz frakciója három fehérjesávot tartalmaz SDS gélen. Mivel az R.BspRI hidroxilapatit frakciójában jelen van a modifikációs metiláz, az M.BspRI tisztítás DNS.agaróz frakciójához hasonló nagyságrendű aktivitásként, feltételeztük, hogy az R.BspRI hidroxilapatit és az M.BspRI DNS.agaróz frakció SDS-gélen azonosítható közös fehérjesávja megfelel a modifikációs metilásznak. Az M.BspRI feltételezett mólsúlya ennek alapján 52.000 ± 2000 dalton. /4. ábra/

Az M.BspRI tisztítás második változatának DNS.agaróz frakciója két fehérjesávot mutat SDS gélen /7. ábra/, melyek mólsúlya 44.000 és 52.000 dalton.

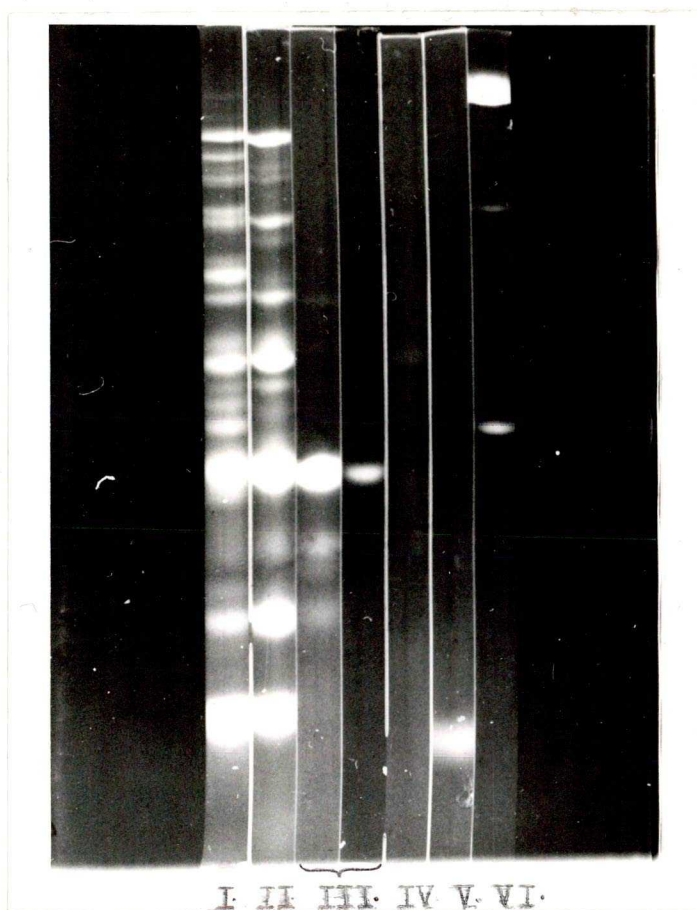
A Sephadex G-150 gélfiltráció során a metiláz mólsúlya 52.000 daltonnak bizonyult.

Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a metiláz a restrikciós endonukleázhoz hasonlóan egyetlen polipeptid láncból áll, melynek mólsúlya 52.000 ± 2000 dalton.

Mindkét tisztítással nyert metiláz preparátum nyomokban szennyezett R.BspRI-el / λ határ 10 μ l felett/, a restrikciós endonukleáz azonban SDS-elektroforézissel kimutathatatlan mennyiségben van jelen.

7/. ábra Az M.BspRI tisztítás frakcióinak SDS gélelektroforézise

Az ábra az M.BspRI tisztítás foszfocellulóz /I./, hidroxilapatit /II./, és a DNS.agarózon szétválasztott R.BspRI /III./ ill. M.BspRI /IV./ frakcióinak SDS gélelektroforézissel nyert képeit mutatja citokróm C /V./, ill. RNS-polimeráz /VI./ mólsúlymarkerek mellett, 7.5%-os akrilamid gélen. / Az elektroforézist 0.8x15 cm-es csövekben 60V/40mA-rel végeztük 6 óráig./



5/. Az R.BspRI jellemzése

Az optimum ismeretének hiányában a vizsgálatok előtt 25mM Tris.HCl /pH 7.5/, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂ puffert használtunk az emésztések során. Az optimumvizsgálatok során ehhez a kiindulási összetételhez képest változtattuk egy-egy komponens koncentrációját ill. hagytuk el, cseréltük fel más-sal az adott összetevőt.

Az enzim pH optimuma

Az optimum meghatározását 25mM Tris.HCl /pH 7.5-10/ és 25mM glicil-glicin /pH 4.5-7.5/ pufferekben, 10mM MgCl₂ jelenlétében, Δ pH= 0.2-enként, 1 μ g λ DNS-t emésztve, olyan körülmények között végeztük, hogy az enzim csak az optimum-határokon belül mutatott teljes vagy ahhoz közel álló emésztést.

Az enzim rendkívül széles pH tartományban képes emésztetni /pH 5.0-10.0/. Az enzim pH optimuma 8.0-8.5 közé esik /pH 8.2/, ebben a tartományban észlelhető a maximális aktivitás /25mM-os Tris.HCl pufferben/. /8. ábra/

Bivalens kationok hatása az R.BspRI aktivitására

Az enzim egyedüli kofaktorként Mg²⁺-ot igényel, ATP és SAM nem befolyásolja az enzim aktivitását. / Ez is bizonyítja, hogy az R.BspRI II. típusu restrikciós endonukleáz./ Magnézium hiányában hasítás nem történik.

Az enzim magnézium optimuma széles, 15-30mM, maximális aktivitást 20mM Mg^{2+} koncentráció mellett kaptunk. /9. ábra/

Az enzim Mg^{2+} igénye nem kizárólagos, Mn^{2+} helyettesítheti a reakcióelegyben. Az R.BspRI a Mg^{2+} -hoz hasonló széles optimumot mutat Mn^{2+} nal is /5-20mM/. A Mn^{2+} optimális koncentrációja alacsonyabb, mint a Mg^{2+} -é, 10mM, de a reakciósebesség kisebb, mint Mg^{2+} jelenlétében. /10. ábra/

Mn^{2+} -nal az optimális koncentráció felett az emésztés aspecifikussá válik.

Mg^{2+} és Mn^{2+} együttes jelenlétében az emésztési kép nem változik. Optimális Mg^{2+} koncentráció mellett magasabb Mn^{2+} koncentráció /20-30mM/ sem okoz gátlást, sem aspecifikus emésztést.

A Cu^{2+} nem képes a Mg^{2+} helyettesítésére. Eltérően más restriktációs enzimektől nem okoz abszolút inaktiválódást. 5mM Cu^{2+} jelenlétében / egyébként optimális körülmények között/ még teljes emésztést kapunk.

Az enzim Zn^{2+} -el nem mutat aktivitást. Zn^{2+} az enzim erős inhibitora, már 2mM koncentrációja is teljes gátlást okoz.

Ca^{2+} és Fe^{2+} nincs hatással az enzim aktivitására.

Ionerősség hatása az R.BspRI-re

Az enzim a só teljes elhagyása mellett is működőképes. 100-150 mM NaCl ill. KCl koncentrációval arányos gátlás növekedést eredményez, mely 400mM felett teljessé válik. /11. ábra/

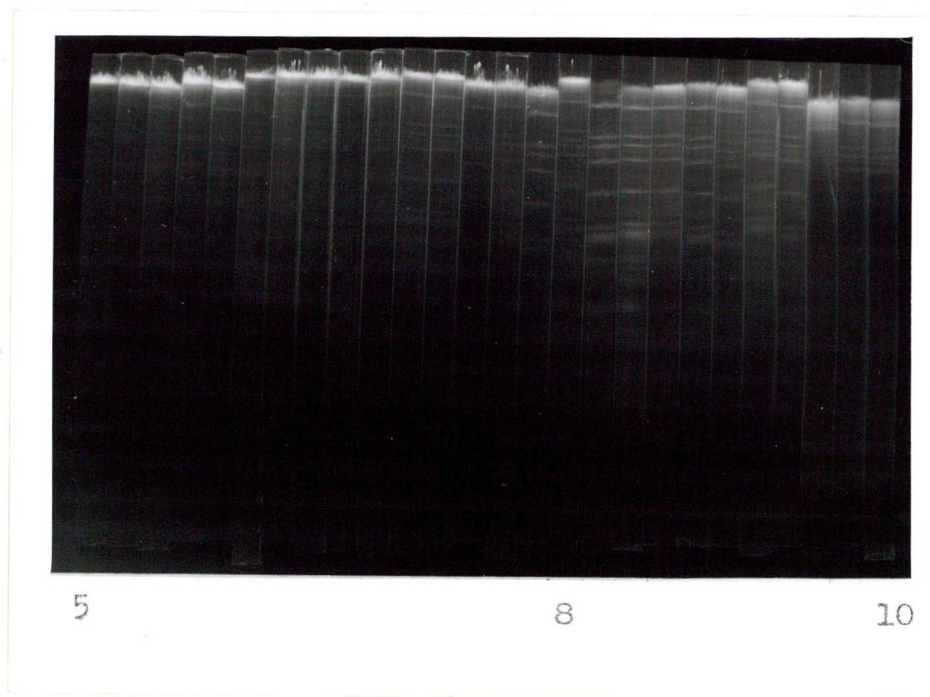
A gátlás reverzibilis. Igen nagy ionerősség mellett /1.5-2M/, hig oldatban az enzim gyorsan és irreverzibilisen inaktiválódik.

8/. ábra Az R.BspRI pH optimumának meghatározása

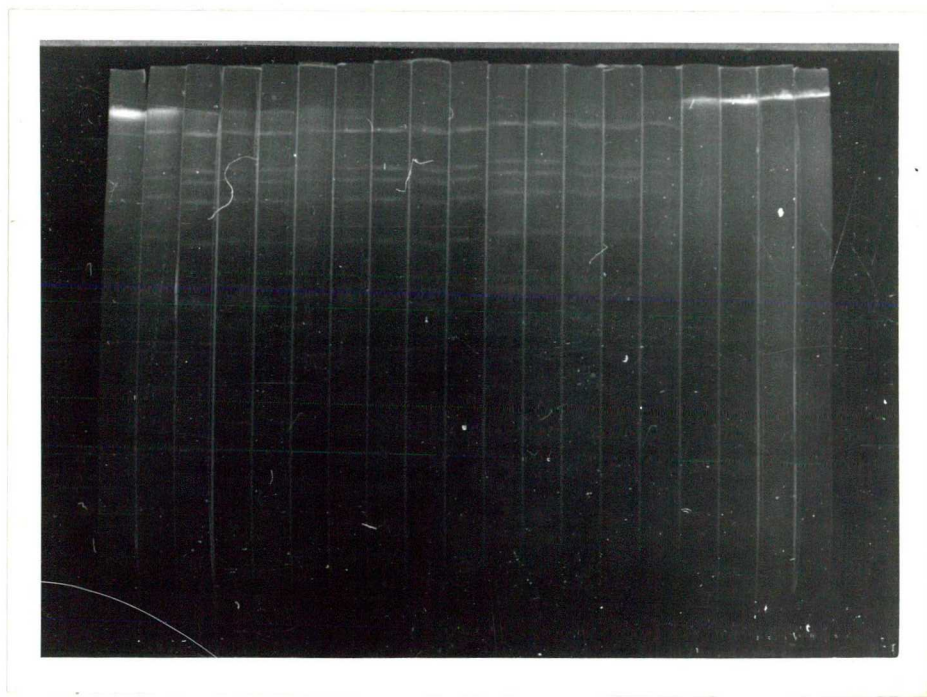
A reakcióelegy 50mM NaCl-ot, 10mM Mg^{2+} -ot, pH 4.5-7.5 között 25mM glicil-glicint, pH 7.5-10.0 tartományban 25mM Tris.HCl-t, valamint 1 μ g λ DNS-t és 0.1 λ E R.BspRI-et tartalmazott. A reakcióelegyek pH-ja 0.2-enként változott. A reakcióelegy komponenseit 0-4 °C-on mértük össze, majd az enzim előzetes hozzáadása után 37°C-ra melegítve, a reakciókat egyszerre indítottuk. 1 óra emésztési idő után a reakciókat leállítottuk, majd 0.6x8 cm-es csövekben /7.5V/cső/ elektroforetizáltuk a reakcióelegyeket, 0.5 μ g/ml ethidium-bromidot tartalmazó 1.0%-os agaróz gélen, 0.5-1.0 óráig. A géleket rövid hullámhosszu UV lámpa alatt fényképeztük.

9/. ábra Az R.BspRI optimális Mg^{2+} igényének meghatározása

A reakcióelegyek 25mM Tris.HCl -t /pH 8.0/, 50mM NaCl-ot, 1 μ g λ DNS-t és 1 λ E R.BspRI-et tartalmaztak. A Mg^{2+} koncentrációt 1-200mM határok között változtattuk. / A reakciót 4 °C-ról 37°C-ra való melegítéssel indítottuk, majd az elegyet elektroforetizáltuk. / A reakcióelegyek sorrendben /balról jobbra/ 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 80, 120, 160 μ M $MgCl_2$ -ot tartalmaztak.



8/. ábra Az R.BspRI pH optimumának meghatározása



9/. ábra Az R.BspRI optimális Mg^{2+} igényének meghatározása

10/. ábra Mn²⁺ hatása az enzimreakció sebességére

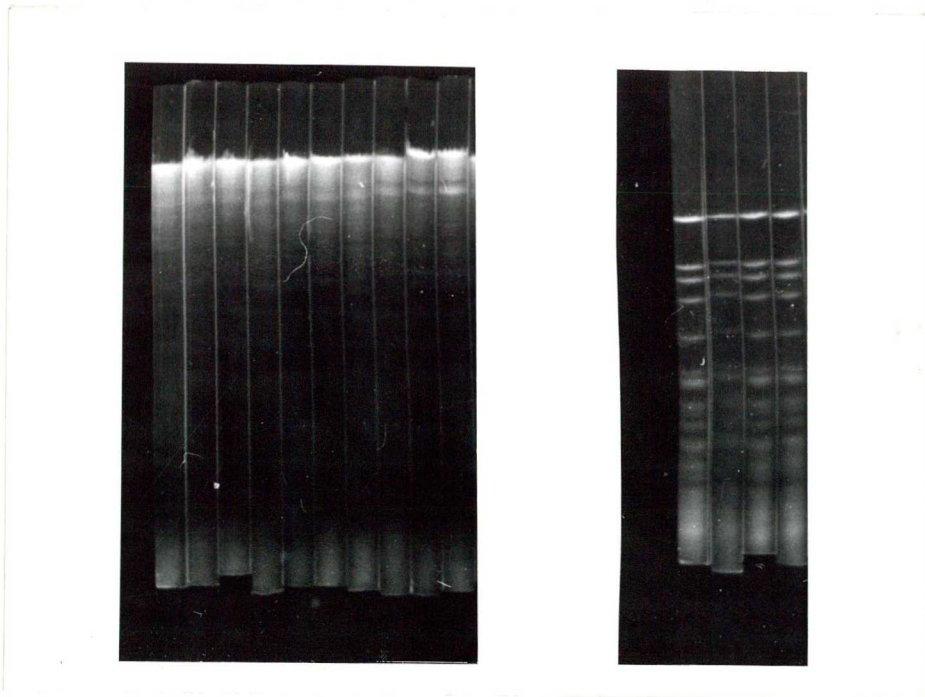
A reakcióelegyek összetétele a következő volt: 25mM Tris. HCl /pH 8.0/, 50mM NaCl ill. a/ esetében 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 16, 20mM Mn²⁺; b/ esetében 8, 12, 16, 20mM Mg²⁺. 1 µg λ DNS-t emésztettünk 1 λ E R.BspRI-el 1 óráig 37°C-on, majd a reakcióelegyeket az előzőekhez hasonlóan elektroforetizáltuk.

11/. ábra Ionerősség hatása az R.BspRI aktivitására

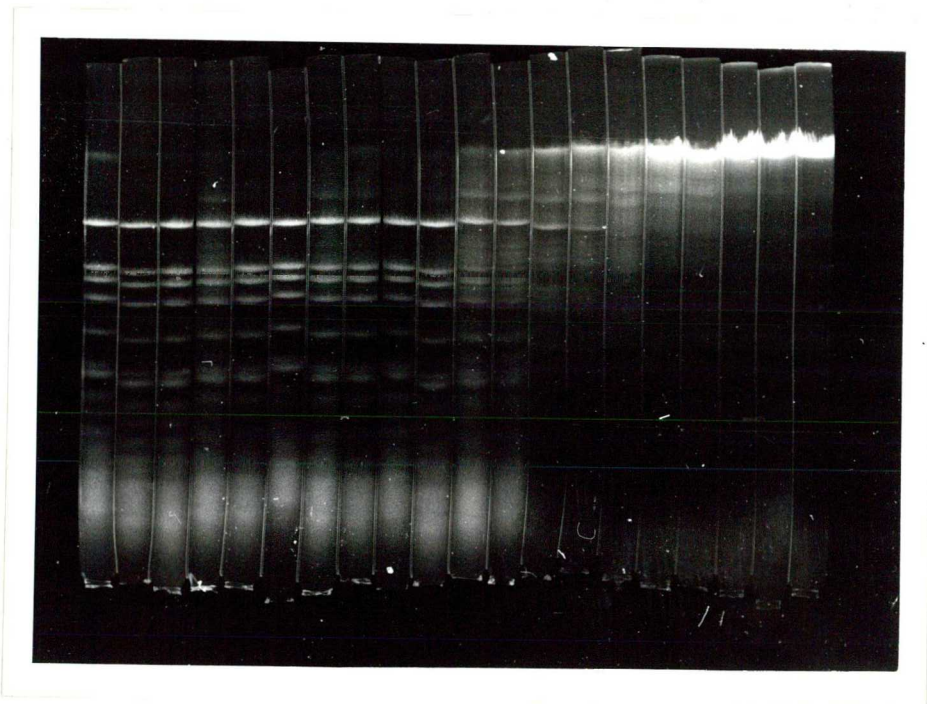
A reakcióelegyek összetétele a következő volt: 25mM Tris. HCl /pH 8.0/, 20mM MgCl₂, 1 µg λ DNS, 1 λ E R.BspRI. A reakcióelegyek /sorrendben balról jobbra/ 8, 16, 24, 32, 40, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 240, 280, 320, 360, 400mM NaCl-et tartalmaztak. / A mintákat 1 óráig inkubáltuk 37°C-on, majd a reakció leállítását után 0.7%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk./

Az R.BspRI stabilitása

Az enzim a tisztítás során igen nagy stabilitást mutatott. Aktivitása, 50%-os glicerinnben tárolva - 20 °C-on, 8-12 hónapig nem csökkent. Hig oldatban a tiszta enzim gyorsan inaktív válik 37°C-on. 30 perc inkubáció alatt aktivitása felére csökken. Ez a hatás 0.01% BSA adásával tökéletesen kivédhető.



10/. ábra Mn^{2+} hatása az enzimreakció sebességére



11/. ábra Ionerősség hatása az R.BspRI aktivitására

A BSA-val védett enzim 8 óra alatt aktivitásának csak 10%-át veszti el. A liofilezett enzimpreparátum eredeti aktivitásának 10%-át őrzi meg.

Az R.BspRI szubsztrátspecifitása

Az R.BspRI restrikciós endonukleáz DNS specifikus. Nem hasítja az E. coli 16S és 23S riboszómális RNS-eket, sem a kettős szálú /RF/ Sindbis virus RNS-t. /Mindkét esetben /P³²/-jelzett RNS-eket emésztettünk nagy feleslegű R.BspRI-el, az enzimreakció optimumkörülményei között és autoradiográfiával azonosítottuk az emésztési termékeket./

Korábbi vizsgálatokból ismert /62/, hogy az R.BspRI felismerőszekvenciája 5' G-G-C-C 3', az enzim a HaeIII isoschizomerje.

A II. típusu restrikciós endonukleázok nagy többsége csak kettős szálú DNS-en aktiv. Néhányról /54-56/ azonban, így a G-G-C-C felismerőhelyű enzimek csoportjának legismertebb képviselőjéről, a HaeIII-ról, kimutatták, hogy - bár jóval kisebb sebességgel - egyszálú DNS hasítására is képes.

Arra vonatkozóan, hogy ez a kétségtelenül specifikus hasítás ugyanazon a helyen következik-e be, mint a kettős szálú szubsztráton ill. ha igen, akkor a hasítás egyszálú helyeken, vagy egyetlen szál távoli komplementer szakaszával időlegesen kialakult rövid kettős szálú régiókban történik-e, egészen a legutóbbi időig nem volt egységes álláspont.

Blakesley és Wells, egyes szálú ϕ X 174 DNS-t különböző



magas /37-62 °C/ hőmérsékleten emésztve, igazolták, hogy egy adott hőmérsékleti érték /58°C/ felett, ahol az időlegesen kialakult kettős szálú régiók létrejötteinek valószínűsége alacsony, a HaeIII restrikciós endonukleáz, szemben a ϕ X 174 RF DNS-en azonos hőmérsékleten mutatott aktivitásával, nem emészti az egyes szálú DNS szubsztrátot. A hasítás, tehát szigorúan kettős szálú strukturát igényel. /87/ Ezek az adatok valószínűsítik az egyes szálú ϕ X 174 DNS R.BspRI hasításra vonatkozó, korábbi kísérleteinkből levont, következtetések helyességét.

Megvizsgáltuk, hogy a ϕ X 174 DNS, amelynek kettős szálú /RF/ formáját az R.BspRI 11 fragmentre hasítja, szubsztrátja-e az enzimnek. /P³²/-jelzett ϕ X 174 DNS-t emésztettünk nagy feleslegű R.BspRI-el, majd az emésztési termékeket elektroforézis után autoradiográfiával azonosítottuk. A 13. ábráról megállapítható, hogy az egyszálú ϕ X 174 DNS-ből 11 fragment keletkezik, amelyek elektroforetikus mintázata azonban lényegesen különbözik a kétszálú DNS-ből származó fragmentekétől. /12. ábra/ Ennek magyarázata az egyszálú és kétszálú DNS bázisösszetételében és térszerkezetében lévő különbségek eltérő hatása lehet.

Az emésztés sebessége egyes szálú ϕ X 174 szubsztrátot alkalmazva nagyságrenddel kisebb, mint kettős szálú ϕ X 174 DNS esetén.

Hasonlóan, mint kettős szálú DNS esetén, az enzim képes Mn²⁺-t felhasználni Mg²⁺ helyett. Az emésztés Mn²⁺-nal ebben az esetben is lassabb, mint Mg²⁺-mal.

Az egyszálú ϕ X 174 DNS szubsztrátja az M.BspRI-nek is, amely megvédi az R.BspRI hasításával szemben.

Annak eldöntésére, hogy az R.BspRI ugyanazon a helyen hasítja-e az egyes szálú DNS szubsztrátot, mint a kettős szálú, a következő kísérletet végeztük el. In vitro olyan kettős szálú ϕ X 174 hibrid DNS molekulát készítettünk, melynek virális szála $/P^{32}/$ jelzett. Az így nyert ϕ X 174 hibrid duplex DNS-t elválasztottuk a szennyező egyes szálú, $/P^{32}/$ -jelölt ϕ X 174 DNS-től hidroxilapatit kromatográfiával, majd az esetleges egyes szálú virális DNS szennyeződés tökéletes eliminálása céljából a hibrid duplex frakciót egyes szálú DNS specifikus S1 nukleázzal emésztettük.

A hibrid ϕ X 174 kettős szálú DNS R.BspRI hasítási termékeit 7M ureát tartalmazó 4%-os akrilamid gélen elektroforezizáltuk, a $/P^{32}/$ ϕ X 174 virális DNS hasítási termékeivel párhuzamosan.

A két emésztés elektroforetikus mintázata megegyező, mely azt bizonyítja, hogy az R.BspRI restrikciós endonukleáz az egyes szálú DNS szubsztrátot a kettős száluval azonos helyeken hasítja. /14. ábra/

A hasítás módjának felderítésére, azaz, hogy az enzim valódi egyes szálú vagy csak időlegesen kialakult un. hairpin strukturákat képes-e hasítani, esetünkben nehéz kísérleti igazolást találni. Alacsony enzimkoncentráció / $5 \lambda E$ / jelenlétében, egyes szálú DNS-t emésztve különböző időtartamokig, a teljes emésztési képhez viszonyítva, egyes fragmentkategóriák nem jelennek meg, prolongált emésztések során /8 óra/ sem.

Feltételezhetően, ezeken a hasítóhelyeken, térbeli szerkezetük következtében, kis valószínűséggel jöhet létre időleges kettős szálu struktúra. Ezt látszik alátámasztani, hogy teljes emésztés csak nagy enzimefelesleggel /50-100 μ E/ érhető el. /15. ábra/ /Az enzimekoncentráció növelésével nő a hasítás valószínűsége is, az egyes felismerőhelyekre vonatkoztatva./

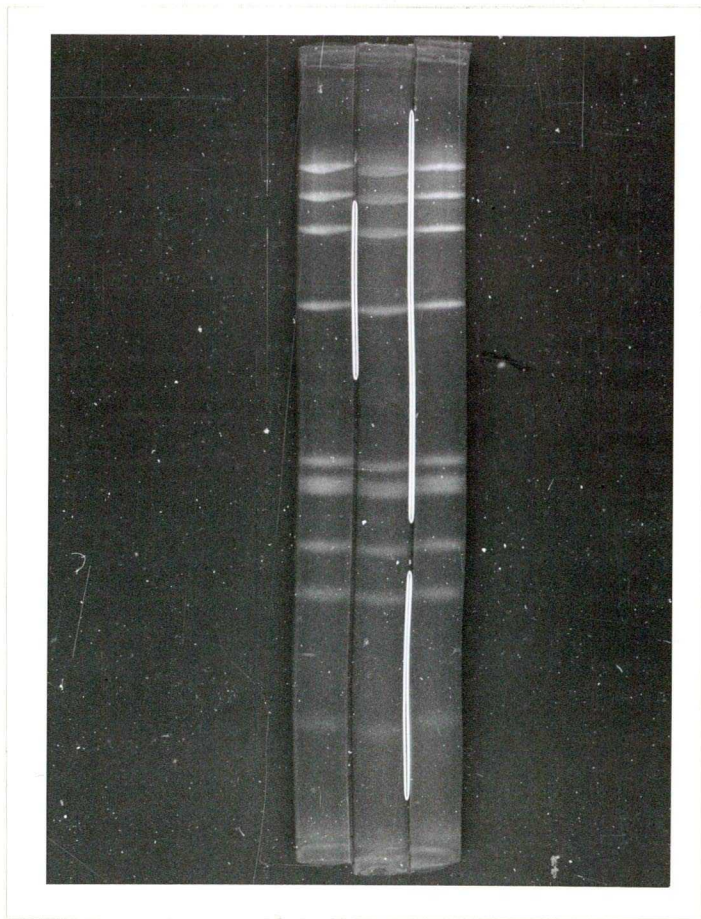
Ezek alapján levezethető lenne, hogy az enzim, hasonlóan az isoschizomer HaeIII-hoz, kettős szálu struktúrát ismer fel és képes hasítani, ennek igazolására azonban közvetlen bizonyítékokkal nem rendelkezünk.

12/. ábra ϕ X 174 RF DNS emésztési képe R.BspRI-el

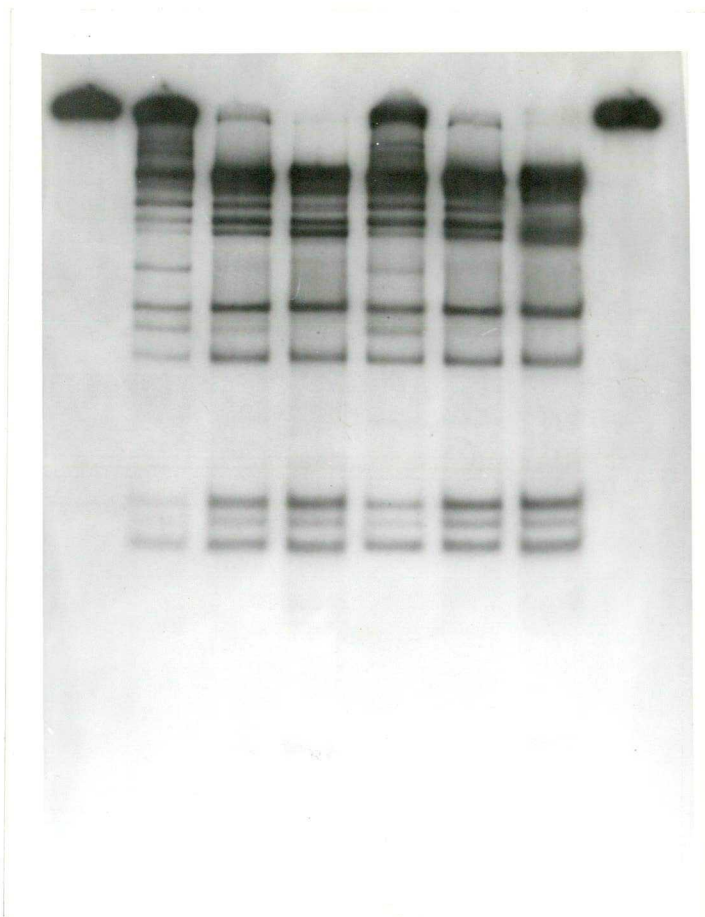
Az ábra a ϕ X 174 RF I DNS emésztési képét mutatja R.BspRI-el, BsuRI-el ill. R.BspRI + BsuRI enzimekkel 4%-os akrilamid gélen. / Kiss A./

13/. ábra /P³²/ ϕ X 174 DNS emésztése R.BspRI-el

1.5 μ g /P³²/ ϕ X 174 /virális/ DNS-t emésztettünk 400 /II.V./, 1000 /III.VI./ és 2000 μ E /IV.VII./ R.BspRI-el optimális körülmények között 2 óráig 37°C-on. A reakció leállítása után a mintákat 4%-os lemez akrilamid gélen elektroforetizáltuk 60V/40mA mellett 12 óráig. A gél szárítás után autoradiografáltuk / 3 óráig/. Az ábra az autoradiogramról készült fényképet mutatja.



12/. ábra ϕ X 174 RF DNS emésztési képe R.BspRI-el



13/. ábra $^{32}\text{P}/\phi$ X 174 DNS emésztése R.BspRI-el

12/. ábra ϕX 174 RF DNS emésztési képe R.BspRI-el

13/. ábra /P³²/ ϕX 174 DNS emésztése R.BspRI-el

14/. ábra /P³²/ ϕ X 174 DNS és virális szálon /P³²/-jel-
zett hibrid duplex ϕ X 174 DNS hasítása R.BspRI-el

1 μ g /P³²/ ϕ X 174 DNS-t /spec.a. 276.000 cpm/ μ g//I./ ill.
0,2 μ g hibrid duplex ϕ X 174 DNS-t /II./ emésztettünk 25 λ E
R.BspRI-el 1 óráig 37°C-on, majd a reakciók leállítása után
az elegyeket denaturáló gélen elektroforetizáltuk. Az ábra
az autoradiogramról készült fényképet mutatja.

15/. ábra Egyes szálú /P³²/ ϕ X 174 DNS enzinkoncentrá-
ciófüggő hasítása R.BspRI-el

1 μ g /P³²/ ϕ X 174 DNS-t emésztettünk 50 λ E R.BspRI-el
1 óráig ill. 5 λ E R.BspRI-el 1-8 óráig 37°C-on. A reakció-
kat leállítva az emésztési termékeket denaturálás után 7M
urea-4% akrilamid gélen elektroforetizáltuk. /I./ 50 λ E/1 óra,
/II./ 5 λ E/ 1 óra, /III./ 5 λ E/8 óra

Számos új problémát vet fel az a kísérlet, amelyet vi-
rális szálon /P³²/-jelzett, komplementer szálon in vitro M.
BspRI metilált hibrid duplex ϕ X 174 DNS-sel végeztünk.

Az egyik szálon metilált hibrid molekulát in vitro M.BspRI
metilált ϕ X 174 RFI és egyes szálú /P³²/ ϕ X 174 DNS-ből készi-
tettük a fentiekhez hasonlóan.

Az R.BspRI nem képes hasítani a mindkét szálon Bsp-speci-
fikusan metilált DNS-t, amit a kísérletben az in vitro M.BspRI
modifikált, HpaI hasított ϕ X 174 fragmentek R.BspRI-el szem-

beni pozitív védési tesztje is igazolt. A felismerőhely egyik szálának specifikus metilálása azonban nem gátolja a másik szál restrikciós endonukleáz általi hasítását. Az R.BspRI specifikusan, a kettős száluval azonos felismerőhelyeken hasítja az egyik szálon metilált hasítóhelyeket tartalmazó hibrid duplex molekula komplementer, metilálatlan, /P³²/-jelzett szálát. /16. ábra/

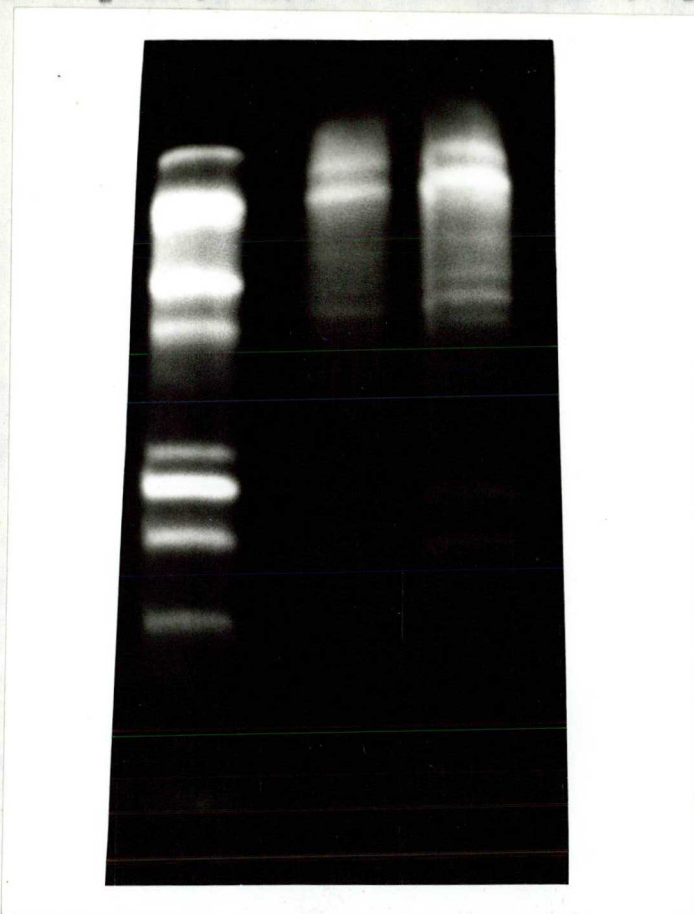
Mivel az egyik szálon metilált hibrid duplex DNS egy replikációs intermedier molekula modelljeként fogható fel, nem elképzelhetetlen, hogy a Bsp restrikciós-modifikációs enzimek, az EcoRI-hez hasonló, helyspecifikus rekombinációs folyamatban játszhatnak szerepet in vivo, ennek igazolására azonban további kísérleti adatok szükségesek. /60/

16/. ábra Egyik szálon M.BspRI metilált, másik szálon /P³²/-jelzett hibrid duplex ϕ X 174 DNS emésztése

2 μ g /P³²/ ϕ X 174 DNS-t ill. 0.3 μ g egyik szálon M.BspRI metilált hibrid duplex ϕ X 174 DNS-t emésztettünk 4 óráig 37°C-on 150 λ E ill. 100 λ E R.BspRI-el. Az emésztési termékeket denaturálva 7M urea-4% akrilamid gélen elektroforetizáltuk, majd a gélt 1 ill. 4 napig autoradiografáltuk. Az ábra az autoradiogram fényképét mutatja.

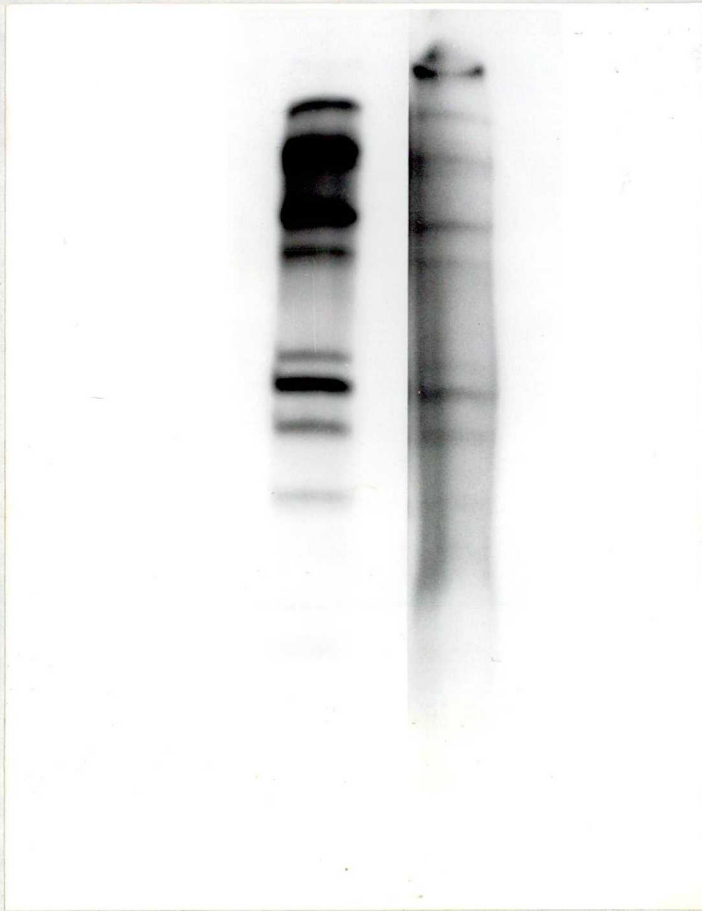


14/. ábra P^{32} / ϕ X 174 DNS és virális szálon P^{32} -jelzett hibrid duplex ϕ X 174 DNS hasítása R.BspRI-el



15/. ábra Egyes szálú P^{32} / ϕ X 174 DNS enzinkoncentrációfüggő hasítása R.BspRI-el





16/. ábra Egyik szálán M.BspRI metilált, másik szálán /P³²/-jelzett hibrid duplex ϕ X 174 DNS emésztése

6/. Az M.BspRI modifikációs metiláz jellemzése

A modifikációs metilázt nem sikerült az R.BspRI-hez hasonlóan homogenitásig tisztítani. Következésképpen jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk az M.BspRI-ről, mint restrikciós endonukleáz párjáról. Az enzim nem igényel Mg²⁺-ot, ATP-t, egyedüli kofaktora az S-adenozil-L-/metil/-metionin. Az M.BspRI specifikusan védi a DNS szubsztrátot az R.BspRI hasításával szemben.

a/. Bármely DNS M.BspRI-el történő in vitro metilálással rezisztenssé tehető az R.BspRI hasításával szemben. /Ezt használtuk fel a védési tesztek során./ A metilálás folyamata /C¹⁴/ vagy /H³/-jelzett S-adenozil-L-³metil/-metionint használva kofaktorként nyomon követhető.

Telítési /teljes/ metilálást végezve meghatározható bármely DNS-en a felismerőhelyek /specifikus szekvenciák/ száma.

A metiláló elegyek 50-100 µg λDNS-t, 80-100 U M.BspRI-et, 15-80 nmól /1-8 nmól /H³/SAM/ SAM-t tartalmaztak. /500 µl térfogatban/ A metilálást 50 µl-es aliquotokat véve, a mintákat DE 81 filterre szűrve, a beépülést számolva követtük. A telítést jelszó platót elérve, ahol további enzim és SAM adása nem eredményezte a beépülés növekedését, a teljes metilálást ellenőriztük R.BspRI emésztéssel. /27. ábra/ Ismerve a reakcióelegyben lévő λDNS mennyiségét és a /H³/ /ill. /C¹⁴/ jelzett SAM specifikus aktivitását, a telítésnél mért radioaktivitásból meghatározható a λDNS-en lévő M.BspRI /és egyben R.BspRI/ felismerőhelyek száma.

Kontrollként hasonló körülmények között, R.BspRI emésztett λDNS-t metiláltunk. Feltételeztük, hogy az M.BspRI nem képes a restrikciós endonukleáz emésztette DNS fragmentek metilálására.

Az emésztetlen λDNS-en a telítési metilálást 5-6 óra alatt értük el, a telítési értékből meghatározott felismerőhelyek száma 125-150, amely jól megegyezik a korábban közölt adatokkal./62/

A kontrollként használt R.BspRI- λ fragmentek esetén is

észleltünk metil-csoport beépülést, kisebb sebességgel, mint intakt λ DNS szubsztrát esetén. / 30 μ M SAM koncentráció, 220 U/ml metiláz mellett 37°C-on 18.6 pmól/óra R.BspRI λ fragmenteken, 52.3 pmól/óra intakt λ DNS-en 1 pmól λ DNS-re vonatkoztatva.//Az adatok közelítő értékek, mivel a $/H^3/SAM$ specifikus aktivitásának ellenőrzését nem végeztük el./

A metilálást 30 óráig tovább folytatva az intakt λ DNS-en a telítési platóval elért érték nem változott, amíg az R.BspRI fragmentek metilálása /502 pmól/pmól DNS értékkel/ magas metilálási platót ért el. / A telítési metilálás kísérletek egy tipikus beépülési görbéjét a 18. ábra mutatja./

Mivel jelenleg nem rendelkezünk adatokkal a metiláz specifikitására vonatkozóan R.BspRI hasított DNS szubsztráton és nem igazolt, hogy M.BspRI preparátumunk nem tartalmaz egyéb, szemyező metiláz /bár ez gyakorlatilag kizárható/, így csak feltételelesen fogadhatjuk el a λ DNS-re meghatározott M.BspRI felismerőhelyek számát.

Nem zárható ki azonban, hogy a λ DNS-R.BspRI fragmentekkel észlelt "tulmetilálás" a metiláz egy eddig ismeretlen specifikitásának eredménye.

A metilálási reakció kezdeti sebessége egyenesen arányos az alkalmazott SAM koncentrációkkal. A metilálás Michaelis-Menten kinetikát követ. $/K_M$ és V_{max} értékeket csak a fenti kísérleti feltételek tisztázása után lehet megadni./

A leírt kísérletekből látható, hogy az in vitro metilálási reakció, az endonukleolitikus reakcióhoz viszonyítva rendkívül lassu folyamat.

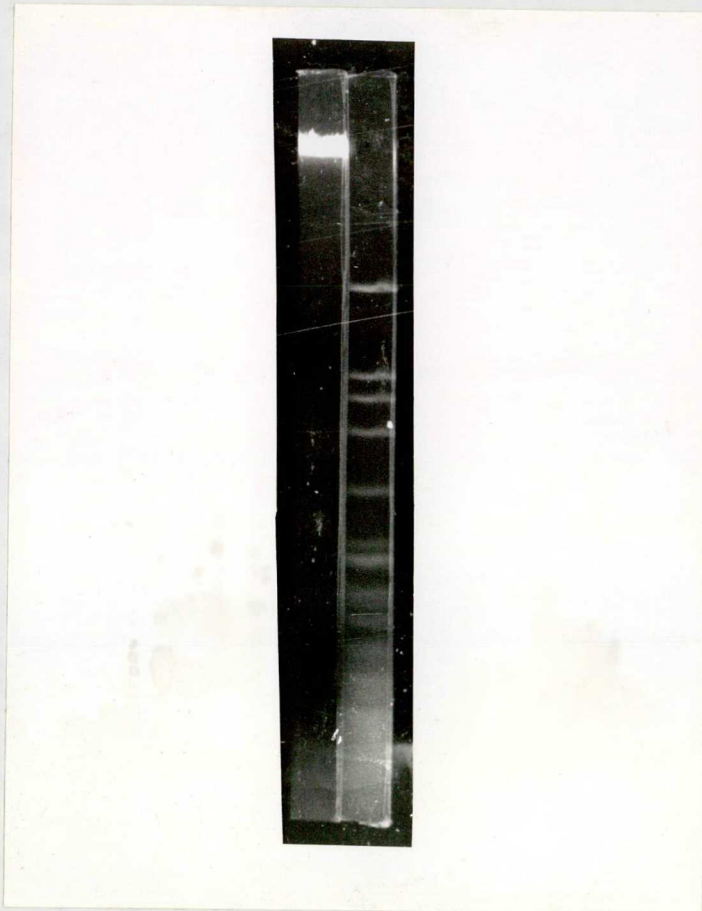


17/. ábra Az in vitro metilálás teljességének ellen-
őrzése védési teszttel

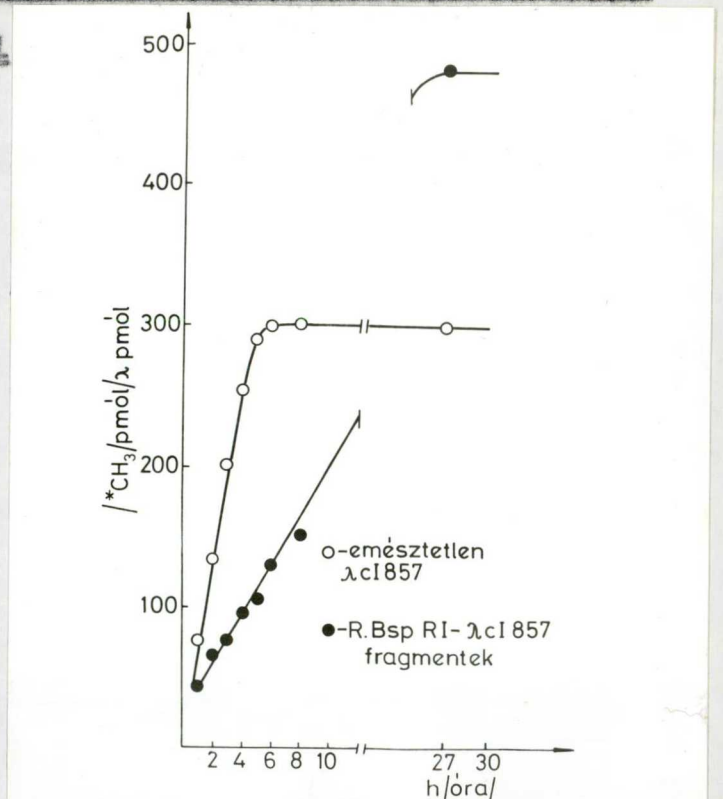
Előzetesen in vitro metilált 2 μg λ DNS-hez 20mM MgCl_2 -
ot, 10 λ E R.BspRI-et adtunk, az elegyet 37°C -on 1 óráig
inkubáltuk, majd a reakciókat leállítva, metilálatlan, R.BspRI
emésztett λ DNS kontroll jelenlétében elektroforetizáltuk 1%-
os agaróz gélen. Az ábra a metilálás befejeztével, a metilált
 λ DNS teljes védettségét mutatja a restriktációs enzim emész-
tésével szemben, a kontroll cső mellett.

18/. ábra λ DNS és R.BspRI- λ DNS fragmentek metilálása
M.BspRI-el

A reakcióelegyek 100 μl 5xtömény metiláz puffert, 110 U
M.BspRI-et, 0.01% BSA-t, 55 μg λ cI857 DNS-t ill. 55 μg R.BspRI
fragmentált λ DNS-t tartalmaztak. A SAM koncentrációja az
elegyben 15-100 μM volt. / A SAM tízszeresen /izotóp/ hígí-
tott ^3H /SAM-t tartalmazott./ A metilálást 37°C -on végeztük,
az 50 μl -es mintákat DE 81 papír filterre szűrtük, toluolos
elegyben aktivitásukat Beckman LS200 folyadék szcintillációs
számlálón mértük, majd a beépült metil-csoportok mennyiségét
pmól λ DNS-re meghatároztuk.



17/. ábra Az in vitro metilálás teljességének ellenőrzése védési teszttel



18/. ábra λ DNS és R.BspRI- λ DNS fragmentek metilálása M.BspRI-el

b/. A metilálás specificitásának vizsgálatára elvégeztük az in vitro $/C^{14}/SAM$ -nal telítésig metilált λ cI857 DNS kvalitatív bázisanalízisét. 50 μ g $/C^{14}/$ -metilált λ DNS-t 175°C-on 30 percig roncsoltunk 98%-os hangyasavval 1mg csirke vvt. DNS jelenlétében. / A csirkevér DNS-nek az volt a szerepe, hogy a kromatogramon az egyes bázisok helyét lokalizálni tudjuk, melyre egyébként nem volna lehetőség, mivel az 50 μ g

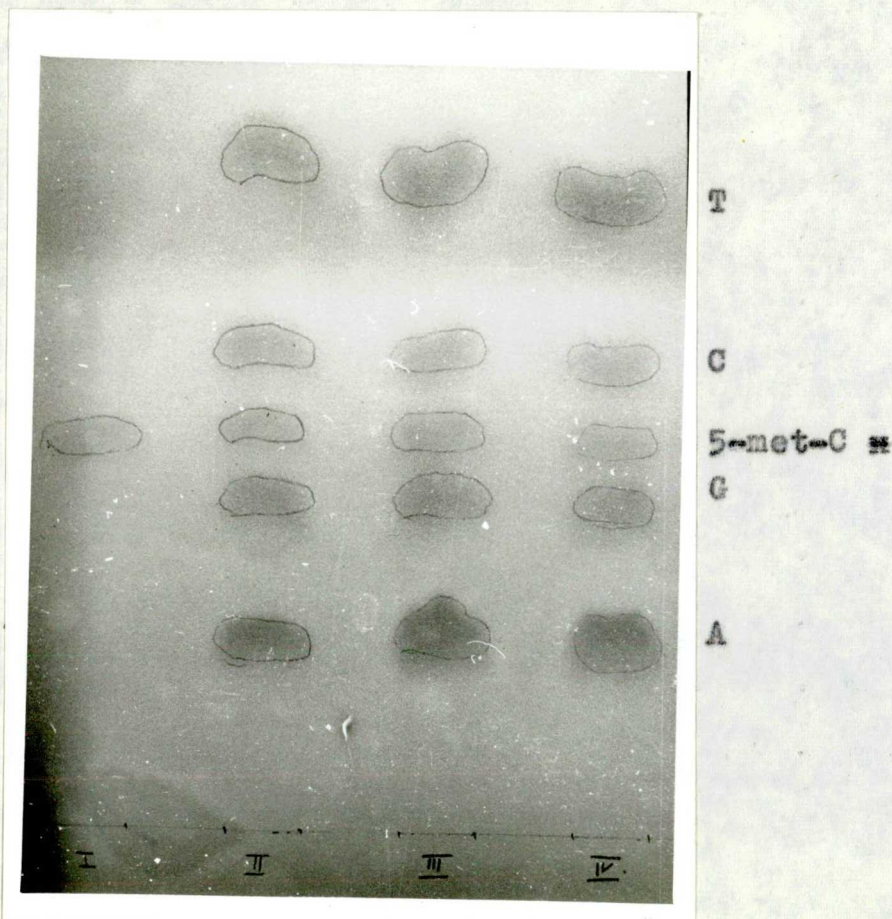
λ DNS-ből származó bázisok mennyisége a kromatográfiás kimutatási határ alatt van./ A hidrolízist követően a hangyasavat elpárologtattuk, a hidrolizátumot 1N HCl-ban kationcserélő Fixion 50-X8 vékonyrétegre vittük. A 19. ábra mutatja, hogy Fixion rétegen egydimenziós kromatográfiával is igen jó elválasztás érhető el. A sósav elpárologtatása után a kromatogramon UV lámpa alatt a foltok helyzetét meghatároztuk, majd a réteget autoradiografáltuk. A röntgenfilmet a kromatogramra helyezve megállapítottuk, hogy a $/C^{14}/$ jelzés döntő többsége a kromatogramon az 5-metil-citozinnak megfelelő helyen található. Az M.BspRI modifikációs metiláz következtében citozin-5-metiltranszferáz; a Bsp felismerőhely valamelyik citozinjét metilálja. / Valószínű, hogy a vele azonos szekvenciát modifikáló HaeIII metilázhoz hasonlóan a $\#$ -gal jelölt citozint metilálja 5' $\begin{matrix} \# \\ G-G-C-C \\ C-C-G-G \end{matrix}$ 3'/.
 $\#$

c/. Azt, hogy az általunk vizsgált metiláz valóban specifikus helyeken / Bsp felismerőhelyeken/ lévő citozin bázisokat metilál és nem általában citozint, az is bizonyítja, hogy az in vitro M.BspRI-el metilált λ DNS-t az / 5' C-C-G-G 3' /

felismerőhelyű HpaII és a / 5' C-C-C-G-G 3' / felismerőhelyű SmaI éppen úgy emészti, mint a metilálatlant.

19/. ábra In vitro M.BspRI metilált λ DNS hidrolizátum vékonyréteg kromatográfiája

50 mg λ cI857 DNS-t roncsoltunk / a fent leirt körülmények között/ 1 mg csirke vvt. DNS jelenlétében. A hidrolizátumot /két részletben III. IV./ 50 μ l 1N HCl-ban vittük a vékonyrétegre, 5-10 μ l / 25-50 μ g/ 5-metil-citosinnal / 5-met-C/ együtt. Markerként 5-10 μ l / 5 mg/ml/ adenint /A/, guanint /G/, timint /T/, citozint /C/ és 5-metil-citozint vittünk fel. /II. ill. I. helyre 5-metil-citozint/ Az ábra mellett *gal jelöltük a /C¹⁴/ jelzés helyét.



IV. Összefoglalás

Munkánk során továbbfejlesztettük a *Bacillus sphaericus* R restrikciós endonukleáz korábbi /62/ tisztítási eljárását, az R.BspRI-et homogenitásig tisztítottuk.

Bizonyítottuk, biokémiai módszerekkel, hogy az R.BspRI szekvenciaspecifikus endonukleáz, restrikciós enzim.

Az R.BspRI 30.000 dalton molsúlyú fehérje, a vizsgált körülmények között monomer, egyedüli kofaktorként Mg^{2+} -ot igényel.

Meghatároztuk az endonukleolitikus reakció optimális feltételeit. Vizsgáltuk különböző bivalens kationok hatását az enzim aktivitására.

A Mg^{2+} optimális koncentrációja 20mM. Szemben a jól ismert EcoRI endonukleázzal, hasonlóan a BstRI-hez, azt találtuk, hogy az enzim Mn^{2+} -nal is működőképes, bár a reakció sebessége ebben az esetben kisebb. Zn^{2+} az enzim erős inhibitora.

Gyakorlati szempontból rendkívül fontos, hogy az enzim a tisztítás során stabil, az enzimreakció csak magas ionerősséggel gátolható, a gátlás reverzibilis, irreverzibilis gátlás csak rendkívül nagy sókoncentrációk alkalmazása esetén következik be. Az enzim a pH változásaira kevésbé érzékeny, széles pH tartományban működőképes /pH 5.0-10.0/ Az enzim pH optimuma pH 8.2.

Az R.BspRI 5' G-G-C-C 3' specifikus, a HaeIII isoschizomerje.

Az enzim különleges jellemzője, hogy képes az egyes szálú DNS szubsztrát hasítására. Az egyes szálú DNS szubsztrátot az enzim a kettős szálú DNS-nek megfelelő helyeken, feltehetően, az időlegesen kialakuló kettős szálú /hairpin/ régiókban hasítja.

Az R.BspRI specifikusan hasítja az egyik szálán metilált duplex DNS-t, a metilálatlan felismerőszekvenciákat hordozó szálon. A jelenség feltételezett biológiai szerepe /ui. helyspecifikus rekombináció/ jelenleg nem igazolt. Az eddig vizsgált restriktív endonukleázok közül egyedül a BsuRI, az R.BspRI isoschizomerje mutat még hasonló tulajdonságot.

A *Bacillus sphaericus* R-ből kimutattuk a restriktív enzimnek megfelelő modifikációs aktivitást és a modifikációs metiláz /M.BspRI/ közel homogenitásig tisztítottuk. Megállapítottuk, hogy a modifikációs metiláz citozin-metil-transzferáz, mely specifikus szekvenciáknál /Bsp felismerőhelyek/ citozinokat metilál, modifikálja a DNS-t, megvédve ezzel a restriktív enzim hasításával szemben.

Az M.BspRI 52.000 dalton mólusúlyú fehérje. Egyedüli kofaktorként S-adenozil-L-/metil-/metionint igényel.

Az egyes szálú DNS-t a kettős szálú DNS-nek megfelelő szekvenciáknál képes metilálni.

Az M.BspRI modifikációs metiláz részletes jellemzése még további munkát igényel.

A *Bacillus sphaericus* restriktív-modifikációs rendszere jó lehetőséget szolgáltat a szekvenciaspecifikus fehérje-DNS kölcsönhatások molekuláris mechanizmusainak enzimológiai és fizikokémiai módszerekkel való további vizsgálataihoz.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Venetianer Pálnak és dr. Kiss Antalnak munkám elméleti, gyakorlati irányításáért, dr. Duda Ernőnek, dr. Sain Bélának, dr. Tomasz Jenőnek és dr. Nagy Ágnesnek hasznos módszertani tanácsaikért, valamint a Nukleinsav Csoport összes tagjának munkám elkészítése során nyújtott közvetlen segítőkészségükért.

Irodalom

- 1/. S.E. Luria - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
1953. 18. 237.
- 2/. D. Dussoix; W. Arber - J.Mol.Biol. 1962. 5. 37.
- 3/. W. Arber; D. Dussoix - J.Mol.Biol. 1962. 5. 18.
- 4/. W. Arber - Ann. Rev. Microbiol. 1965. 19. 365.
- 5/. W. Arber; S. Linn - Ann. Rev. Bioch. 1969. 38. 467.
- 6/. W. Arber - The Bacteriophage Lambda - Host controlled variation 1971. Cold Spring Harbor Laboratory, New York 83.
- 7/. H.W. Boyer - Ann. Rev. Microbiol. 1971. 25. 153.
- 8/. M. Meselson; R. Yuan; J. Heywood - Ann. Rev. Bioch.
1972. 41. 477.
- 9/. W. Arber - Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1974. 14. 1.
- 10/. B. Nathans; H.O. Smith - Ann. Rev. Bioch. 1974. 44. 273.
- 11/. J.R. Roberts - CRC Critical Reviews in Biochem. 1976. 123.
- 12/. T.A. Trautner; B. Pawlek; S. Bron; C. Anagnostopoulos -
MGG 1974. 131. 181.
- 13/. R. Yoshimori - Genetic and Biochemical Analysis of the
Restriction and Modification of DNA by Resistance Trans-
fer Factors Ph.D. Thesis, Univ. of California, San Francis-
co, 1971.
- 14/. M. Betlach; G. Hershfield; L. Chow; W. Brown; H.M. Goodman;
H.W. Boyer - Fed. Proc. 1976. 35. 2037.
- 15/. H. Smith; D. Nathans - J.Mol.Biol. 1973. 81. 419.
- 16/. M. Meselson; R. Yuan - Nature 1968. 217. 1110.
- 17/. S. Linn; W. Arber - PNAS 1968. 59. 1300.
- 18/. H.O. Smith; K.W. Wilcox - J.Mol.Biol. 1970. 51. 379.

- 19/. T.J. Kelly; H.O. Smith - J.Mol.Biol. 1970. 51. 393.
- 20/. K. Danna; D. Nathans - PNAS 1971. 68. 2915.
- 21/. F.W. Studier - J.Mol.Biol. 1975. 94. 283.
- 22/. W. Arber - How do bacteriophages protect themselves against restriction? - Nuclease Symposium, Szeged, 1977.
- 23/. A. Haberman - J.Mol.Biol. 1974. 89. 545.
- 24/. F. Arwert; D. Rutberg - MGG 1974. 133. 175.
- 25/. H.R. Smith; G.O. Humphreys; G.A. Willshaw; E.S. Anderson - MGG 1976. 143. 319.
- 26/. G. Vovis; Horiuchi K.; N. Zinder - PNAS 1974. 71. 3810.
- 27/. G. Vovis; N. Zinder - J. Mol. Biol. 1975. 95. 557.
- 28/. J.A. Lautenberger; S. Linn - J.Biol.Chem. 1972. 247. 6176.
- 29/. B. Eskin; S. Linn - J.Biol. Chem. 1972. 247. 6183.
- 30/. R. Yuan; A.T. Bickle; W. Ekbers; Ch. Brack - Nature 1975. 256. 556.
- 31/. G. Dykes; R. Bambara; K. Marians; R. Wu - Nucl. Acid Res. 1975. 2. 327.
- 32/. Restriction and Modification Enzymes and Their Recognition Sequences compiled by R.J. Roberts Cold Spring Harbor Laboratory, August, 1977.
- 33/. T. Shibata; S. Ikawa; Ch. Kim; T. Ando - J. Bact. 1976. 128. 473.
- 34/ S. Lacks; B. Greenberg - J.Biol.Chem. 1975. 250. 4060.
- 35/. S. Lack; B. Greenberg - J.Mol.Biol. 1977. 114. 153.
- 36/. P.H. Roy; H.O. Smith - J.Mol.Biol. 1973. 81. 427.
- 37/. P.H. Roy; H.O. Smith - J.Mol.Biol. 1973. 81. 445.
- 38/. P.J. Green; M.S. Poonian; A.L. Nussbaum; L. Tobias; D.E. Garfin; H.W. Boyer; H.M. Goodman - J.Mol.Biol. 1975. 99. 237.

- 39/. H.B. Hann; H.O. Smith - Nucl. Acid Res. 1977. 4. 4211.
- 40/. J. Reiser; R. Yuan - Experimentia 1975. 31. 745.
- 41/. H. Slor - Nucl. Acid Res. 1975. 2. 897.
- 42/. H.O. Smith - Methods Mol. Biol. 7. 71.
- 43/. P.A. Sharp; B. Sugden; J. Sambrook - Biochem. 1973. 12. 3055.
- 44/. F.W. Studier - J. Mol. Biol. 1973. 79. 237.
- 45/. P. Modrich; D. Zabel - J. Mol. Biol. 1976. 251. 5866.
- 46/. A.L. Smith; J.G. Chirikjian - Fed. Proc. 1977. 36. 908.
- 47/. J.F. Catterall; N.E. Welker - J. Bact. 1977. 129. 1110.
- 48/. G.H. Jr. Sack - The Use of Restriction Endonuclease HpaI in the Analysis of Simian Virus 40 Ph.D. Thesis, Johns Hopkins University, Baltimore Md. 1974.
- 49/. S. Shaltiel; Z. Er-El - PNAS 1973. 70. 778.
- 50/. J. Sümegi; D. Breedveld; P. Hossenlopp; P. Chambon - BBRC 1977. 76. 78.
- 51/. T.A. Bickle; V. Pirotta; R. Imber - Nucl. Acid Res. 1977. 4. 2561.
- 52/. S. Bron; K. Murray; T.A. Trautner - NCG 1975. 143. 13.
- 53/. B. Polisky; P. Green; D.E. Garfin; J.B. McCarthy; H.M. Goodman; H.W. Boyer - PNAS 1975. 72. 3310.
- 54/. K. Horiuchi; N.D. Zinder - PNAS 1975. 72. 2555.
- 55/. R. Blakesley; R. Wells - Nature 1975. 257. 421.
- 56/. G.N. Godson; J.R. Roberts - Virology 1976. 73. 561.
- 57/. S. Forsblom; R. Rigler; M. Ehrenberg; V. Petterson; L. Philipson - Nucl. Acid Res. 1976. 3. 3255.
- 58/. H. Thomas; R. Davis - J. Mol. Biol. 1975. 91. 315.

- 59/. W. Gilbert; A. Maxam - A New Method Sequencing DNA /kézirat/
60/. S. Chang; S. Cohen - PNAS 1977. 74. 4811.
61/. Szekeres M. - Diplomamunka 1976. JATE, Szeged
62/. Kiss A.; Sain B.; Csordás-Tóth É.; Venetianer P. - Gene
1977. 1. 323.
63/. B. Harbers; A. Delaney; K. Harbers; J. Spancer - Biochem.
1976. 15. 407.
64/. R.R. Burgess; J.J. Jendrisak - Biochem. 1975. 14. 4634.
65/. V.M. Vogt; - Eur. J. Bioch. 1973. 33. 192.
66/. R.J. Roberts /leközletlen kézirat/
67/. J. Sambrook / " " /
68/. C.A. Wilson; F.E. Young - J.Mol.Biol. 1975. 97. 123.
69/. J.R. Kruh - Methods in Enzymology XII/B. 728. 1968.
70/. J.H. Miller - Experiments in Molecular Genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972.
71/. J. Marmur - J.Mol.Biol. 1961. 3. 208.
72/. M. Gross-Bellard, P. Oudet, P. Chambon - Eur.J.Bioch.
1973. 36. 32.
73/. C.A. Hutchison III.; R.L. Sinsheimer - J.Mol.Biol. 1966.
18. 429.
74/. Katz, Kingsbury, Helinski - J. Bact. 1973. 114. 576.
75/. H. Schaller, Ch. Müsslein; F. Bonhoeffer; Ch. Kurtz; I.
Nietzschmann - Eur.J. Bioch. 1972. 26. 474.
76/. M. Greth; A. Chavallier - BBA 1975. 390. 168.
77/. A. Tiselius; Hjertén S.; Ö. Levin - Arch. Bioch. Biophys.
1956. 65. 132.
78/. K. Weber; M. Osborn - J. Biol. Chem 1969. 244. 4406.

- 79/. T. Jovin; A. Chrambach; M.A. Naughton - Anal. Bioch.
1964. 9. 351.
- 80/. R.B. Helling; H.M. Goodman; H.W. Boyer - J. Virol. 1974.
14. 1235.
- 81/. W.M. Bonner; R.A. Laskey - Eur. J. Bioch. 1974. 46. 83.
- 82/. O.H. Lowry; N.J. Rosebrough; A.L. Farr; R.J. Randall -
J.Biol.Chem. 1951. 193. 265.
- 83/. Tomasz J. - Anal. Bioch. 1975. 68. 226.
- 84/. F. Stolzénbach - Methods in Enzymology / Colowick I.P.;
Kaplan N.O./ 1966. IX. 278.
- 85/. A. Torriani - Procedures in Nucleic Acid Research 1967.
/Cantoni G.L; Davis D.R./ 224.
- 86/. Ovchinnikov Yu.A.; Lipkin V.M.; Modyanov N.N.; Chertov
O.Yu.; Szmironov Yu.V. - FEBS Lett. 1977. 55. 108.
- 87/. R.W. Blakeley, J.B. Dodgson, I.F. Nes, R.D. Wells -
J.Biol.Chem. 1977. 252. 7300.
- 88/. R.A. Rubin; P. Modrich - J.Biol.Chem 1977. 252. 7265.

