

T4 fág indukált polinukleotid kináz felhasználása
DNS szerkezet kutatásban

Doktori disszertáció

Csordás-Tóth Éva

MTA. Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézete

1978

A doktori disszertációt az MTA SZBK Biokémiai Intézetének Nukleinsav Csoportjában készítettem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Venetianer Pálnak, aki lehetővé tette számomra e munka elvégzését, és irányította munkámat. Külön köszönettel tartozom Dr. Udvardy Andornak, Dr. Sümegi Jánosnak és Dr. Kiss Antalnak értékes tanácsaikért, utmutatásukért, valamint csoportunk minden tagjának baráti segítségéért, technikai munkatársaim, Heisig Ágnes és Turi Klára lelkiismeretes és szorgalmas munkájáért, mely nagy segítséget jelentett kísérleteim elvégzésében.

Köszönetemet fejezem ki a Genti Molekuláris Biológiai Intézet professzorának, Walter Fiers-nek és munkatársának, Hugo Van Heuverswyn-nek, akik segítséget nyújtottak számomra a DNS szekvenciázási módszernek, a Maxam-Gilbert technikának az elsajátításában.

TARTALOM

	Old.
Tartalomjegyzék	
A felhasznált rövidítések jegyzéke	
I. Bevezetés	1.
II. Irodalmi áttekintés	4.
III. Anyagok és módszerek	
A/1. Vegyszerek	17.
2. Tápoldatok	18.
3. Enzimek	18.
B/ Módszerek	
1./ Restriktív enzim emésztések és ellenőrzésük	19.
2./ Radioaktivitás mérés	20.
3./ Szubsztrátok készítése T4 fágindukált kináz aktivitásának méréséhez	
a/ 5'-OH DNS szubsztrát preparálása	20.
b/ γ - ^{32}P /ATP szubsztrát készítése	21.
4./ T4 fágindukált polinukleotid kináz aktivitásának mérése	26.
5./ T4 fágindukált polinukleotid kináz tisztítása	27.
6./ Restriktív endonukleázzal történő emésztéssel nyert DNS fragmentumok polinukleotid kinázos jelölése	30.
7./ DNS 5' terminális nukleotidjának meghatározása	31.
8./ pBR313 plazmid DNS preparálása	32.
9./ DNS fragmentum izolálása agaróz gélből	34.
10./ ^{32}P -jelölt dupla szálú DNS fragmentum izolálása 12%-os poliakrilamid gélből	34.
11./ ^{32}P -jelölt DNS fragmentum izolálása 12%-os poliakrilamid gélből szálalválasztással	35.
12./ Maxam-Gilbert-féle bázis-specifikus kémiai reakciók kivitelezése	36.
IV. Kísérleti eredmények, az eredmények megbeszélése	39.
V. Összefoglalás	65.
VI. Irodalomjegyzék	67.

A felhasznált rövidítések jegyzéke

AMP	: adenzin-5'-foszfát
ADP	: adenzin-5'-difoszfát
ATP	: adenzin-5'-trifoszfát
BAP	: bakteriális alkális foszfátáz
BspR	: Bacillus sphaericus-ból izolált restrikciós endonukleáz
CMP	: citidin-5'-foszfát
DEAE-cellulóz	: dietil-amino-etil-cellulóz
DTT	: Cleland reagens, ditiotritol
EDTA-Na ₂	: etilén-diamino-tetraecetsav dinátrium só /Selecton B ₂ /
EcoRI	: Escherichia coli RY13-ból izolált restrikciós endonukleáz
GAPDH	: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GSH	: redukált glutation
HindIII	: Haemophilus influenzae-ből tisztított restrikciós endonukleáz
2-MEA	: 2-merkaptotanol
NTP	: dezoxiribonukleozid trifoszfát /dATP, dCTP, dGTP, UTP/
P _i	: szervetlen foszfát
PCA	: perklórsav
3-PGK	: 3-foszfoglicerát kináz
POPOP	: 1,4-di-/2,5-fenil-oxazoil/-benzol
PP _i	: szervetlen pirofoszfát
PPO	: 2,5-difenil-oxazol
mRNS	: messenger /hírvivő/ ribonukleinsav
rRNS	: riboszómális ribonukleinsav
tRNS	: transzfer ribonukleinsav
SDS	: nátrium-dodecil-szulfát
TCA	: triklór-ecetsav
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
tris	: tris-/hidroximetil/-amino-metán

I. BEVEZETÉS

Az utóbbi két évtizedben számos olyan biológiai probléma merült fel, amelyek megoldása aszimmetrikusan jelölt makromolekulák felhasználását igényli. A korábbi *in vivo* radioaktív jelölési technikák alkalmazásával egyenesen jelölt makromolekulák szintézisére nyílt csak lehetőség, másrészt, számos esetben, pl. eukariota mRNS-eknél, nem lehetett olyan mértékű radioaktív jelölést elérni, amely részletesebb szerkezetvizsgálatot lehetővé tett volna.

Ezért nagy jelentőségű volt a 60-as évek közepén az a felfedezés, hogy T4 bakteriofággal fertőzött *Escherichia coli* kivonatokban azonosítottak egy enzimet, az ún. polinukleotid kinázt (1), amely (γ - ^{32}P)ATP-ből a γ -helyzetben lévő ^{32}P -jelzett foszfát csoportot átviszi 5'-végükön szabad hidroxil csoporttal rendelkező makromolekulákra, és ezáltal módot nyújt nagymólsúlyú DNS és RNS molekulák szelektív radioaktív jelölésére. A kináznak ez a képessége alkalmassá teszi, hogy egy másik fágindukált enzimmal, a T4 DNS ligázzal együtt, hasznos eszközként kerüljön felhasználásra nukleinsavak szerkezet- és funkcióvizsgálatában.

A fágindukált kinázzal végzett *in vitro* foszforilezés módot nyújt polinukleotidok 5' terminális nukleotidjének meghatározására, specifikusan jelölt nukleinsavak előállítására, amelyek azután más enzimek tanulmányozására felhasználhatók, olyan polinukleotidok *in vitro* jelölésére,

amelyek in vivo jelölése nehézségekbe ütközik, DNS szekvencia meghatározására stb.

A 70-es évek elején kidolgoztak olyan - enzimatis reakciókon alapuló - módszereket is, amelyek lehetővé teszik DNS molekulák 3'-OH csoportjának jelölését. Teljesen dupla szálú DNS esetében mind a T4 DNS polimeráz, mind az *Escherichia coli* polimeráz I katalizál egy kicserélődési reakciót a 3' terminális nukleotid és egy megfelelő (^{32}P)dNTP között (2, 3). Dupla szálú DNS egyik szálának jelölésénél a DNS polimeráz részleges repair szintézissel (^{32}P)dNTP-t épít be, amelynek során az 5' kiálló szálát templátként használja fel (4, 5).

Egy másik módszer alkalmazása során (^{32}P)ribonukleotidot és dezoxinukleotidil terminális transzferázt használnak fel egyszálú és kétszálú DNS molekulák 3' végének radioaktív jelölésére (6).

Az említett in vitro jelölési technikák közül azonban egy sem versenyezhet a polinukleotid kinázos jelölési módszerrel sem gyorsaságban, sem olcsóságban, sem egyszerűségben.

Csoportunk érdeklődése az elmúlt években a DNS-en található "kitüntetett szekvenciák" (promoter, restrikciós endonukleáz felismerő hely stb.) felé fordult. E problémák tanulmányozásához különleges helyzetben radioaktív jelölést tartalmazó, nagy specifikus aktivitású DNS szakaszok szükségesek, amelyek előállításához hasznos segédeszköznek bizonyul a T4 fág indukált kinázzal és (γ - ^{32}P)ATP-vel végzett in vitro jelölési módszer.

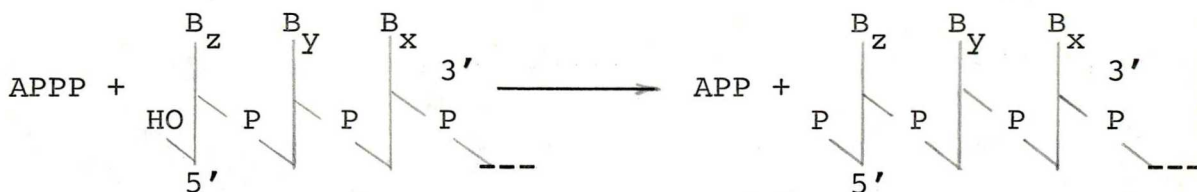
E jelölési módszert használtuk fel a következő problémák megoldására, amelyek egyben a disszertáció anyagát is képezik:

- 1./ Laboratóriumunkban *Bacillus sphaericus*-ből izoláltunk és homogén formában előállítottunk egy új restriktációs endonukleázt, Bsp R-t (7). Vizsgálataink során választ kellett adnunk DNS molekulákon Bsp-emésztéssel előidézett hasítások számáról és
- 2./ a Bsp R hasítási szekvenciájáról (végcsoportanalízissel).
- 3./ Vizsgálataink másik részében a Maxam-Gilbert-féle DNS szekvenálási metodika felhasználásával pBR 313 plazmid DNS HindIII-EcoRI fragmentumának bázisösszetételét határoztuk meg, amely a feltételezések szerint egy promotor régiót tartalmaz.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A polinukleotid kinázt (ATP:defoszfopolinukleotid 5'-foszfotranszferáz, EC 2.7.1.78) elsőként Richardson izolálta T4 bakteriofággal fertőzött *Escherichia coli* extraktumokból (1). Az enzim katalizálja az ATP γ -helyzetű foszfát csoportjának átvitelét poli- és oligonukleotidok, 3'-mononukleotidok és N-védett dezoxioligonukleotidok 5'-hidroxi terminálisára (8). ^{32}P -jelzett ATP-t használva szubsztrátként, mód nyílik jelölt nukleinsavak, oligo- ill. mononukleotidok előállítására.

A polinukleotid kináz által katalizált reakciót az alábbi ábra szemlélteti:



Hasonló specifitásu enzimet izoláltak Novogrodsky és munkatársai T2 bakteriofággal fertőzött *Escherichia coli* sejtekből (9, 10). Eukariota rendszerek közül pl. patkánymáj magban szintén detektáltak polinukleotid kináz aktivitást (11, 12, 13). Levin és munkatársai ugyancsak patkánymájból kitisztítottak egy dezoxiribonukleinsav kinázt, amely RNS-en inaktívnak mutatkozott. (14). Nemrégiben borjútímuszából izoláltak és 1500-szorosára tisztítottak egy, tulajdonságaiban a patkánymáj enzimhez hasonló, polinukleotid

kinázt, amely egyszálu és kétszálu DNS-en kívül RNS-t is képes foszforilálni, bár sokkal alacsonyabb sebességgel, mint DNS-t (15). Polinukleotid kináz aktivitást mutattak ki Lanschütz karcinoma és BHK fibroblaszt sejtvonalaknál, valamint humán limfocitákban (16, 17).

A továbbiakban röviden a T4 fágindukált polinukleotid kináz néhány tulajdonságát emlitenénk meg. A homogenitásig tisztított enzim molekulaszúlya gélszűrés alapján $140000^{+10\%}$ (18). SDS gélelektroforézis alapján az enzim négy $33000^{+5\%}$ alegységből áll (18). Az újabb fiziko-kémiai vizsgálatok bebizonyították, hogy az alegységek azonosak (fenilalanin az N-terminális aminosav), és mindegyik monomer két -SH csoportot tartalmaz (19).

Kétértékű fémiont: Mg^{++} -iont, szulfhidril reagenst és 5' OH csoportot tartalmazó szubsztrátot igényel a működéséhez. Mn^{++} -ion részben helyettesítheti a Mg^{++} -ot, de az optimális Mn^{++} -ion koncentrációnál is csak a Mg^{++} -ion alkalmazásánál talált aktivitásnak a fele észlelhető. 5 mM DTT, 10 mM 2-MEA vagy GSH szükséges az enzimaktivitáshoz.

pH-optimuma tris-pufferben mérve 7,4-8,0.

P_i és PP_i erős inhibitorai az enzimnek (főleg az utóbbi), ugyanis mindkettő szubsztrátanalóggként viselkedik. Nagymértékben gátol az $(NH_4)_2SO_4$ is.

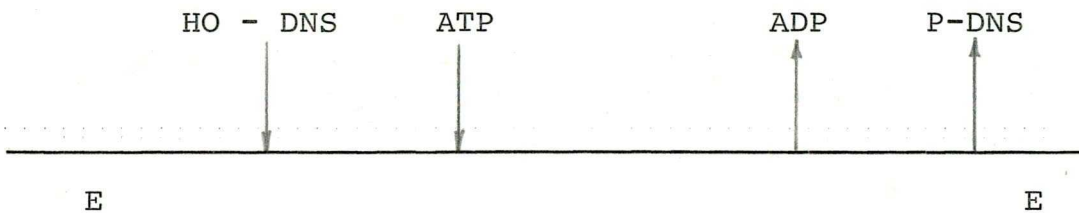
Annak ellenére, hogy a polinukleotid kinázt a nukleinsavak szerkezetkutatásában igen széles körben felhasználják, kevésbé ismert in vivo szerepe. A feltevések szerint szintetikus folyamatokban és a DNS-repair-ben jelentős szerepet

játszik a plinukleotid ligázzal együtt (12, 13, 14, 15).

Lillehaug és Kleppe részletesen tanulmányozták sók, pl. NaCl, KCl, valamint a prokariota, eukariota szervezetekben és bakteriofágokban nagy mennyiségben található poliaminok, pl. spermin, spermidin, T4 polinukleotid kinázra gyakorolt hatását, hogy az enzim in vivo szerepének megértéséhez közelebb jussanak. Kísérleteik alapján sók és poliaminok jelentős enzimaktivitást fokozó hatást fejtenek ki. Különböző egyszáлу DNS-eket, mono- és oligonukleotidokat használva, 3-6-szorosára megnőtt a foszforiláció sebessége az optimális sókoncentrációnál, 0,125M-nál, ill. az optimális poliamin koncentrációnál, 2mM-nál (20).

Van de Sande és munkatársai kimutatták, hogy a T4 polinukleotid kináz által katalizált reakció megfordítható; 5'-³²P-jelölt dezoxinukleotidot és ADP-t kinázzal inkubálva (γ -³²P)ATP-t kaptak, míg ATP jelenlétében adenzin-(δ -³²P)-tetrafoszfát keletkezett (21). A fordított irányú reakció pH-optimuma 6,6. Az a tény, hogy a T4 kináz által katalizált reakció reverzibilis, analógiát mutat jónéhány - a DNS-metabolizmusban szerepet játszó - enzimnél észlelt jelenséggel. Pl.: Escherichia coli DNS-polimeráz I szervetlen pirofoszfát jelenlétében depolimerizálja a DNS-t (22), Escherichia coli RNS-polimeráz katalizál egy pirofoszfát kicserélődési reakciót (23), vagy Escherichia coli polinukleotid ligáz AMP-függő endonukleázként hat (24).

A T4 fágindukált polinukleotid kináz kinetikai vizsgálatával számos közlemény foglalkozik (19, 25-28). Ezek alapján a DNS molekulák foszforilációja során az enzim "ordered sequential" mechanizmussal hat, mind a két szubsztrát reagál az enzimmal, mielőtt bármelyik ledisszociálna:



Só, vagy poliamin jelenlétében a reakciómechanizmus továbbra is "sequential", de valószínűleg "rapid equilibrium" típusu.

Ezek után rátérnénk a plinukleotid kináz gyakorlati felhasználásának ismertetésére. A teljesség igénye nélkül sorolunk fel néhány felhasználási lehetőséget, ugyanis a nukleinsavak szerkezet- és funkcióvizsgálatában olyan kiterjedten használják fel, hogy teljes irodalmának áttekintése igen hosszadalmas lenne.

1./ Elsőként az 5'-terminális nukleotid meghatározását említjük meg. A polinukleotid kinázos módszerrel az 5' végén ^{32}P -jelölt DNS-t a fölös mennyiségű ATP eltávolítása után enzimatis uton 5'-mononukleotidok keverékére bontjuk, és nem radioaktív kontrollok segítségével megállapítjuk, hogy melyik tartalmazza a radioaktivitást. Ezt a módszert használta fel Weiss és Richardson

T7 bakteriofág DNS 5' végcsoportjának analizisére (29-31), vagy Wu és Kaiser γ -bakteriofág DNS ragadós végeinek vizsgálata (32).

- 2./ Felhasználást nyer az enzim nagy molekulás DNS-ben előforduló egyszáлу törések tanulmányozásában (29). Erre az ad lehetőséget, hogy 37 °C-on a bakteriális alkális foszfatáz kvantitatíve hidrolizálja a külső foszomonoésztereket (amelyek a dupla szálu DNS molekula valamelyik végén vannak), de nem hidrolizálja a belső foszomonoésztereket (amelyek egyszálu töréseknél lokalizálódnak). Magasabb hőmérsékleten (65 °C) vagy a DNS denaturációját követően, mind a belső-, mind a külső foszomonoészterek elhidrolizálhatók alkális foszfatázzal. 37 °C-on végzett alkális foszfatázos emésztéssel, és azt követő enzimátikus foszforilálással a fölös mennyiségű ATP eltávolítása után a beépült aktivitásértékekből az 5' terminális végek számára következtethetünk. A 65 °C-on végzett defoszforilálás és kinázos jelölés után nyert érték az összes 5' vég számát, míg a két hőmérsékleten kapott eredmény különbsége a DNS molekulában előforduló egyszálu törések számát adja meg. Ezt a módszert használták fel T5 bakteriofág DNS-ben található törések jellemzésére (33), ϕ X174 bakteriofág DNS replikációs köztitermékeinek vizsgálatára (34), riboszómális RNS (35), szatellit dohány nekrozis vírus RNS vizsgálatára (36), ultrahangos kezelés (30), *Micrococcus* nukleáz (1), pankreász DNáz (29, 37), vagy

T4 endonukleáz II és IV emésztés (38, 39) hatására bekövetkező foszfodiészter kötések hasításának tanulmányozására.

- 3./ A polinukleotid kinázos in vitro jelölési technika lehetővé teszi specifikusan jelölt nukleinsavak előállítását, amelyek a DNS-metabolizmusban szerepet játszó enzimek tanulmányozására felhasználhatók.

Pl. a kinázos jelölés nagymértékben meggyorsította a fágindukált polinukleotid ligáz tanulmányozását (29, 40). Számos DNS ligáz mérés olyan DNS szubsztrátot használ fel, amely az egyszáлу töréseknél a plinukleotid kinázal végzett jelöléssel kialakított ^{32}P -foszforil csoportot tartalmaz. Az 5'végek összekapcsolása így egy alkálikus foszfatázzal szemben rezisztens ^{32}P -diészter kialakulásával jár, és a beépült radioaktivitási értékekből következtethetünk az enzim aktivitására. 5'- ^{32}P -jelölt DNS-t és RNS-t használtak fel Becker és munkatársai T4 fertőzött *Escherichia coli* 5'-foszfatáz tisztítására és jellemzésére (41), vagy Klett *Escherichia coli* DNS-polimeráz 5'-hidrolitikus aktivitásának vizsgálatára (42, 43).

- 4./ A T4 fágindukált kináz és ligáz felhasználása módot nyújt meghatározott nukleotid szekven-ciájú dezoxiribonukleotid láncok kémiai szintézisére, amelynek alapján Khorana és munkatársai megvalósították az első mesterséges génszintézist, az élesztő alanin tRNS génjének teljes szintézisét (44-46).

5./ A kinázos jelölés lehetővé teszi olyan polinukleotidok radioaktív jelölését, amelyeket egyébként nehéz in vivo jelölni (47), mRNS-ek in vitro jelölését (48), sőt "cap" szerkezettel rendelkező mRNS-ek jelölésére is kidolgoztak már módszert (49).

Az in vitro enzimatiszus jelölés nem jelölt nukleinsavak fingerprint analizisére is módot nyújt, ugyanis a nukleinsavak emésztésével nyert oligomerek ezzel a módszerrel radioaktíven jelölhetők ^{32}P -vel, és a továbbiakban ugyanolyan módszerekkel frakcionálhatók, mint az in vivo jelölt polimerek (50-53).

6./ A polinukleotid kinázos jelölés felhasználható a DNS molekulában található restrikciós hasítási helyek térképezésére (54). Ha egy DNS molekulát, amelyet egyik végén enzimatiszus uton ^{32}P -vel megjelöltünk, részlegesen emésztünk egy restrikciós enzimmal, jelölt DNS fragmentumok sorozatát kapjuk, amelyeknek közös jelölt végük van, Ezen molekulák méret szerinti eloszlása alapján egy restrikciós hasítási térkép megszerkeszthető.

7./ Végül, de nem utolsó sorban megemlítjük, hogy a T4 fág-indukált kinázzal és $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ -vel való jelölési technika tette lehetővé közvetlen DNS és RNS szekvenciázási módszerek kidolgozását (55-57).

Izolált DNS-szakaszok szekvenciázásának elmélete

Az utóbbi évekig a DNS- szekvenciázás nagymértékben elmaradt a 60-as évek közepén kidolgozott és kiterjedten al-

kalmazott RNS-szekvenciázási módszerektől, amelyek specifikus RNáz-ok használatán alapultak (51-53). Néhány éve azonban a DNS-szerkezetvizsgálat komoly fejlődésnek indult. Ez a fejlődés két szekvenciázási módszer kidolgozásának volt köszönhető, mindkettő nagymértékben különbözik a klasszikus RNS-szekvenciázási módszerektől, és mindkettő jóval gyorsabb.

Az egyik, enzimatis reakciókon alapuló DNS-szekvenciázási módszert 1975-ben Frederick Sanger és Alan R. Coulson dolgozta ki az MRC Laboratóriumban, Cambridge-ben (58), és az irodalomban "plusz és mínusz" módszer néven vált ismertté.

Sangerékkal egyidejűleg Allan Maxam és Walter Gilbert a Harvard Egyetemen kifejlesztettek egy másik, kémiai reakciókon alapuló szekvenciázási módszert (55, 56). Nem túlzás azt mondani, hogy ezek a technikák mintegy új korszakot nyitottak a molekuláris biológia történetében (59). A módszerek teljesítőképességét mi sem igazolja jobban, mint hogy Sanger és munkacsoportja 1977-ben közölte az 5375 nukleotid hosszúságú ϕ X174 bakteriofág DNS teljes szekvenciáját, amit főként a "plusz-mínusz" technika felhasználásával határoztak meg (60). 1978-ban egy kisméretű DNS virusnak, az SV 40-nek a teljes szekvenciáját közölte W. Fiers és munkacsoportja a Nature-ben (munkájuk során a Maxam-Gilbert technikát használták fel) (61). A nukleotidsorrend meghatározás teljesítőképességét csak a poliakrilamid gél felbontóképessége korlátozza, és a gél hosszúságának, valamint az alkalmazott feszültségnek a növelésével fokozható.

Anélkül, hogy részletekbe mennénk, meg kell említenünk néhány okot, amelyek nagymértékben késleltették a DNS-szekven-
ciázás kifejlesztését:

- 1./ Nem álltak rendelkezésre bázis-specifikus DNS-lebontó
enzimek.
- 2./ A legtöbb DNS molekulát nehéz in vivo úgy megjelölni,
hogy specifikus aktivitása megfelelő legyen további
szerkezetvizsgálatra, másrészt, nem volt ismert olyan
módszer, amely egy kérdéses fragmentum jelölését lehető-
vé tette volna.
- 3./ A természetben előforduló DNS molekulák rendszerint nagy
molekulasúlyúak, és a belőlük nyerhető fragmentumok szá-
ma olyan óriási, hogy frakcionálásuk komoly problémát
jelent.

Az első problémára a megoldást a restrikciós endonukle-
ázok felfedezése jelentette. A restrikciós enzimek bakteriális
endonukleázok, amelyek a natív, kétszálu DNS-t egy meghatá-
rozott szekvenciánál specifikusan hasítják oly módon, hogy
felismernek egy 4-6 nukleotidból álló meghatározott bázissor-
rendű szakaszt, és ezen belül hasítják a dupla szálu DNS-t.
A restrikciós-modifikációs rendszerek tanulmányozása 1968-
ban kezdődött, amikor Meselson és Yuan (62), valamint Linn
és Arber közölte az első enzimizolálási adatokat *Escherichia*
coli-ból (63). A restrikciós enzimek gyakorlati felhasználá-
sában az áttörés 1970-ben következett be, és ma már az is-
mert és felhasznált restrikciós enzimek száma meghaladja
a 100-at (64-69). Széleskörűen alkalmazzák őket genom térképe-

zésre, DNS-szekvencia analízisre, génizolálásra, genetic engineering-re. A leggyakrabban használt restrikciós enzimeket az 1. táblázatban tüntettük fel.

Az *in vivo* DNS jelölésnél jelentkező nehézséget kiküszöbölték azáltal, hogy ismertté vált egy DNS jelölési technika T4 fágindukált polinukleotid kináz és (γ - ^{32}P)ATP felhasználásával (1, 18, 27). Nagy specifikus aktivitású jelzett ATP felhasználása lehetővé tette DNS fragmentumok 5'-terminálisának specifikus jelölését is.

Az utóbbi években a DNS frakcionálási módszerek is sokat tökéletesedtek, és főleg az említett szerzők a gélelektroforézises elválasztási módszernek olyan érzékeny változatát dolgozták ki, amelynek felhasználásával már egyetlen nukleotidban különböző tagszámu DNS fragmentumok elválasztása megvalósítható.

Mivel kísérleteink során a Maxam-Gilbert technikát alkalmaztuk, részletesebben ismertetnénk ennek lényegét.

A Maxam-Gilbert technika 5'-végén ^{32}P -vel jelölt egy- és dupla szálú DNS fragmentumra egyaránt alkalmazható. A módszer fő lépései a következők:

- 1./ Megfelelő DNS fragmentum nyerése restrikciós endonukleázzal történő emésztéssel (ideális esetben egymást átfedő restrikciós fragmentumok izolálása).
- 2./ Az 5'-végek (ill. a 3'-végek) defoszforilezése bakterialis alkálikus foszfatázzal.
- 3./ Az 5'-vég jelölése polinukleotid kinázzal és (γ - ^{32}P)ATP-vel, vagy a 3'-vég foszforilálása dezoxinukleotidil terminális transzferázzal és (α - ^{32}P)ATP-vel.
- 4./ Egyik szálán ^{32}P -vel jelölt DNS fragmentum nyerése.

1. táblázat

NÉHÁNY GYAKRAN HASZNÁLT RESTRIKCIÓS ENZIM ÉS FELISMERŐ SZEKVENCIAJUK

Enzim forrása	Elnevezése	Felismert szekvenciák (/a hasítás helye)	Hasítási helyek száma λ	Ad 2	SV 40
Arthrobacter luteus	AluI	AG/CT	> 50	> 50	32
Bacillus amyloliquefaciens H	Bam HI	G/GATCC	5	3	1
Bacillus globiggi	BglI	?	22	12	1
	BglII	A/GATCT	5	10	0
Escherichia coli RY 13	EcoRI	G/AATTC	5	5	1
Escherichia coli R 245	EcoRII	/CCTGG; /CCAGG	> 35	> 35	16
Haemophilus aegyptius	HaeII	PuGCGC/Py	> 30	> 30	1
	HaeIII	GG/CC	> 50	> 50	18
Haemophilus influenzae Rd	HindII	GTPy/PuAC	34	20	7
	HindIII	A/AGCTT	6	11	6
Haemophilus para- influenzae	HpaI	GTT/AAC	11	6	4
	HpaII	C/CGG	> 50	> 50	1
Providencia stuartii 164	PstI	CTGCA/G	18	25	2

Ennél a lépésnél két stratégia követhető:

- a/ A dupla szálú jelölt DNS fragmentumot egy másik restrikciós enzimmel megemésztjük, a nyert fragmentumokat poliakrilamid gélen elválasztjuk, és gélből való izolálás után meghatározzuk a szekvenciáját.
- b/ A mindkét szálán jelölt DNS molekulát denaturáljuk, a szálakat nagy feszültségű elektroforézis-homokromatográfiával (53), vagy gélelektroforézissel elválasztjuk, és gélből való izolálás után mindkét DNS szál szekvenciáját meghatározzuk.

Hayward tapasztalta először, hogy kétszálú bakteriofág DNS molekulák szálai agaróz gélen való elektroforézissel elválaszthatók (70). A DNS komplementer szálai szétválásának okát még nem ismerjük, méret-, alak-, töltésbeli különbségek okozhatják a szétválást. A jelenség egy lehetséges magyarázata az, hogy amikor a DNS szálak denaturálódnak, mindegyik visszagyűrődik önmagán egy sajátos, a nukleotid szekvencia által meghatározott konformációt létrehozva. Ennek következtében a méretben azonos, de szekvenciában különböző komplementer szálak különböző molekuláris alakot képviselnek, és ezért a gélelektroforézis során a gél mátrix különbözőképpen tartja vissza őket (71).

5./ Bázis-specifikus kémiai lebontás.

A felhasznált két reagens, a dimetilszulfát és a hidrazin bázisokkal való reakciója már igen régóta ismert, de szekvenciázási célra az említett szerzők előtt senki sem

használta fel ezeket a reakciókat (72-80).

A modifikáció során a reagens először megtámadja a DNS-t, meglazítja a glükozidos kötést, majd eltávolít egy bázist a cukorról, Az így visszamaradó cukorrész a szénváz gyenge pontja, amely könnyen elhasad: egy lug vagy amin által katalizált β -eliminációs reakció a cukrot teljesen eltávolítja a 3' és 5' foszfátoktól. A reagens és a bázisok közötti reakció korlátozott, statisztikusan egy bázist érint egy 50-100 nukleotid hosszúságú DNS szakaszon. A DNS lánc hasításának viszont ezen a helyen tökéletesnek kell lennie, hogy a vizsgálandó molekulák ne tartsalmazzanak rejtett töréseket.

A purin-specifikus kémiai reagens, a dimetilszulfát, a guaninokat N-7 helyzetben metilezi, míg az adenineket dupla szálu DNS-nél N-3 helyzetben. A reakciókörülmények módosításával elérhető, hogy specifikusan csak az egyik purinnál következzen be hasítás, és így a purinok között különbséget lehet tenni. Hasonló a helyzet a pirimidinek hidrazinos reakciójánál is, és ily módon mind a négy bázisra specifikus reakció végrehajtható.

- 6./ A ^{32}P -jelölt hasítási termékek elválasztása méret szerint 20%-os pliakrilamid -8M karbamid összetételű denaturáló gélen.
- 7./ Autoradiográfia, a nyert autoradiogram alapján a DNS fragmentum szekvenciájának közvetlen leolvasása.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A/1 Vegyszerek

Kísérleteink során főként REANAL, AnalaR, Merck és Sigma gyártmányu analitikai tisztaságu reagenseket használtunk fel. Agaróz gélelektroforézishez Sigma agarózt, poliakrilamid gélelektroforézishez REANAL vagy Merck gyártmányu akrilamidot és BDH gyártmányu N,N'-metilén-biszakrilamidot használtunk, mindkét monomert felhasználás előtt Loening eljárásának megfelelően átkristályosítottuk (81).

70 g akrilamidot 1 liter CHCl_3 -ban oldtunk 50°C -on, majd melegen leszűrtük szivatas közben. Egy éjszakán át -20°C -on tartottuk, és a kivált kristályokat leszűrtük, hideg CHCl_3 -mal mostuk, majd szobahőmérsékleten megszárítottuk.

10 g N,N'-metilén-biszakrilamidot 1 liter acetonban oldtunk $40-50^\circ\text{C}$ -on, majd melegen leszűrtük. Lassan -20°C -ra hűtöttük, a kivált anyagot hideg acetonnal mostuk és megszárítottuk.

Gélelektroforézishez, ill. etidium-bromid-CsCl egyensúlyi centrifugáláshoz Calbiochem gyártmányu etidium-bromidot és Merck gyártmányu CsCl-ot használtunk,

A szekvenciázásnál felhasznált vegyszerek közül a dimetilszulfát (99 %) Aldrich, a hidrazin (95 %) Eastman gyártmányu volt.

A/2 Tápoldatok

A T4amN82 bakteriofág elszaporításához, ill. a fág-indukált enzim preparálásához a baktérium sejteket "G" táptalajon növesztettük, amelynek az összetétele a következő: 3g KH_2PO_4 , 15,1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3g NaCl, 3g Na-citrát, 4g casaminosav, 4g yeast extract /Difco/, 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5% glükóz /1 liter/.

Plazmid preparáláshoz "M9"-es táptalajt, vagy "YTB" táptalajt használtunk, amit 0,5% glükózzal egészítettünk ki (82). Az "M9" tápoldat a következő komponenseket tartalmazta: 15,13g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3g KH_2PO_4 , 0,5g NaCl, 1g NH_4Cl és 20g casaminosav /pH 7,0/. Az "YTB" tápoldat összetétele: 10g tripton /Difco/, 5g NaCl, 5g yeast extract /Difco/ /pH 7,5/.

A/3 Enzimek

Kísérleteink során Worthington gyártmányu bakteriális alkálikus foszfatazt, kigyó méreg foszfodiészterázt és Micrococcus nukleázt használtunk fel. A 3-foszfoglicerát kinázt és glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázt a P.L. Biochemicals-tól vásároltuk. A plazmid DNS preparálásánál felhasznált enzimek közül a lizozim Sigma, az RNáz REANAL, a proteináz-K pedig Merck gyártmányu volt.

Az EcoRI restrikciós enzimet ill. a HindIII enzimet *Escherichia coli* RY13 törzsből, ill. *Haemophilus influenzae* R_d törzsből preparáltuk laboratóriumunkban Yoshimori eljárásának megfelelően (83), ill. Roberts nem publikált leírása szerint. BspR-t a csoportban kidolgozott módszerrel tisztítottuk (7).

B/ MÓDSZEREK

1./ Restrikciós enzimes emésztések és ellenőrzésük

A Bsp és HindIII restrikciós enzimes emésztéseket 10 mM tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, az EcoRI emésztéseket 100 mM tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ pufferben végeztük 37 °C-on, míg teljes emésztést nem kaptunk. A reakciókat általában 1/5 tf. 50% szacharóz, 0,2 M EDTA és 0,1% brómfenolkék oldattal állítottuk le. A restrikciós emésztések teljességét 1%-os cilindrikus vagy lap agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük Helling eljárásának megfelelően (84). A géleket 70-100 V-on futtattuk néhány órán át 0,5 γ/ml etidium-bromid koncentráció mellett 0,04 M tris-HCl pH 7,9, 0,05 M Na-acetát és 0,001 M EDTA pufferben. A restrikciós emésztés során nyert csíkokat UV-fényben láthatóvá tettük, ugyanis az etidium-bromid a DNS-sel olyan komplexet képez, amely ultraibolya sugárzás hatására narancsszinű fénnnyel fluoreszkál. Megfelelően erős ultraibolya sugárzás alkalmazásával már 10-20 ng DNS is szabad szemmel észlelhetően fluoreszkál (85-88).

2. / Radioaktivitásmérés

A ^3H jelzett vagy ^3H - ^{32}P kettős jelölésű mintákat dioxános ill. toluolos koktélban mértük. A dioxános koktél összetétele: 100 g naftalin és 5 g PPO 1 liter dioxánban, míg a toluolos koktélé: 4 g RPO és 0,05 g POPOP 1 liter toluolban.

Kettős jelölésű mintáknál figyelembe vettük az alkalmazott csatorna ^{32}P átfedését a ^3H csatornába.

A ^{32}P jelzett minták radioaktivitását Cserenkov-sugárzás alapján mértük, ill. filteren toluolos koktélban.

3. / Szubsztrátok készítése T4 fágindukált kináz aktivitásának méréséhez

a. / 5'-OH DNS szubsztrát preparálása

Az enzimaktivitás méréséhez 5' végén szabad hidroxil csoportot tartalmazó DNS szubsztrát szükséges, amit úgy nyerünk, hogy borju timusz DNS-t Micrococcus nukleázzal emésztettünk, míg a DNS 30%-a savoldékonyá nem vált.

A Micrococcus nukleáz Staphylococcus kultúrákban található, exo- és endo-5'-foszfodiészteráz aktivitással egyaránt rendelkező nem specifikus nukleáz, amely a DNS ill. RNS molekulák foszfodiészter kötéseit elhidrolizálja, és így 5'-OH és 3'-foszfát véggel rendelkező oligonukleotidokat eredményez (89-92).

A *Micrococcus* nukleázzal történő emésztést Richardson módszerével végeztük (93).

A reakcióelegy /20 ml/ 0,05 M pH 9,2-es glicin puffert, 0,01 M CaCl_2 -ot, 20 μmol borju timusz DNS-t és a szükséges mennyiségű *Micrococcus* nukleázt tartalmazta. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk, míg a DNS 20-30%-a savoldhatóvá nem vált. Az optimális inkubációs időt és enzimkoncentrációt minden esetben próbakísérlet alapján állapítottuk meg. A reakció követése ugy történt, hogy megfelelő időközönként mintát vettünk a reakcióelegyből, 0,4 M végkoncentrációban hideg PCA-t adtunk hozzá, lecentrifugáltuk, majd a felüluszó optikai sűrűségét mértük a 0'-es mintával szemben.

A reakció végén lehűtöttük az inkubációs elegyet, a rövid oligonukleotidokat 1 M KCl-dal szembeni dializissal távolítottuk el, végül 0,2 M KCl-dal szemben dializáltuk. Az oldat optikai sűrűségének meghatározása után -20 °C-on tároltuk.

b./ (γ - ^{32}P)ATP szubsztrát készítése

A fágindukált polinukleotid kináz aktivitásának mérésehez, végcsoport- és fragmentszám meghatározáshoz alacsonyabb specifikus aktivitású preparátum is megfelelt, míg a DNS-szekvenciázás szükségessé tette magas specifikus aktivitású jelzett ATP szintézisét.

α / Az alacsonyabb specifikus aktivitású preparátumot ADP-ből kiindulva, ^{32}P ortofoszfátot és spenót kloroplaszt

szuszpenziót felhasználva fotoszintetikus foszforilálással állítottuk elő (94).

A kloroplasztot közvetlenül a felhasználás előtt friss spenótlevelekből izoláltuk Jagendorf és Avron módszerével (95). 25 g friss spenótlevelet porcelán mozsárban 60 ml 0,4 M szaharóz, 0,05 M tris-HCl pH 7,8, 0,01 M NaCl oldattal eldörzsöltünk, kettős rétegű gézen leszűrtük, alacsony fordulatszámú centrifugálással, Janetzki K23 centrifugán 90 sec. 1200 rpm-en, kiülepitettük a durva törmeléket, majd a felülusztót 9'-ig centrifugáltuk 3000 rpm-en 2 °C-on. A kiülepedett kloroplasztot kétszer mostuk a 0,4 M szaharóz-tris-NaCl oldattal, és az utolsó centrifugálás után az említett oldat 2,5 ml-ében szuszpendáltuk fel a kloroplasztot.

A fotoszintetikus foszforilálásnál a reakcióelegy (3 ml) a következő komponenseket tartalmazta:

- 200 μ mól tris-HCl pH 7,8
- 25 μ mól $MgCl_2$
- 0,1 μ mól fenazin metosulfát
- 1 μ mól glutation
- 8 μ mól ADP / Na_2 -só/
- 1-3 μ mól hideg ortofoszforsav
- 10-15 mCl hordozómentes ^{32}P (neutralizált forma)
- 0,2 ml kloroplaszt szuszpenzó

A 15-20 °C-os vízfürdőn tartott reakcióelegyet 15'-ig 500 W-os halogénlámpával besugároztuk. A reakció leállítása 200 μ l 20%-os $HClO_4$ -val történt, majd lehűtés és állás után /5' 0 °C-on/ Janetzki K24-es centrifugán 15000rpm-en lecentrifugáltuk a kicsapódott fehérjéket.

A felülszót 2N KOH-dal neutralizáltuk, a kivált KClO_4 csapadékot lecentrifugáltuk.

A ^{32}P -jelölt ATP-t oszlopkromatográfiás uton tisztítottuk tovább 4 °C-on.

1/ Az első lépésben Dowex 1 / HCO_3^- ciklusu, 200-400 mesh szemcsenagyságu/ anioncserélő gyantán tisztítottuk a preparátumot /oszlopméret: 0,5 x 5 cm/.

Az anyagrávitel után 0,2 M KHCO_3 -oldattal alaposan mostuk az oszlopot. A mosás során a jelzett szervesetlen foszfát és a szennyezésként jelenlévő kis mennyiségű nukleozid monofoszfát távolítható el az oszlopról.

Rövid 0,4 M KHCO_3 mosással a nukleozid difoszfát, míg 0,8 M KHCO_3 oldattal a trifoszfát eluálódik. Ezt a tisztítási lépést az 1. ábra tünteti fel.

2/ Az aktiv frakciókat egyesítettük, fölös mennyiségű, H^+ ion ciklusu Dowex 50 W kationcserélő gyantával K^+ -mentesítettük, majd a gyanta kiszűrése után a szűrletet vagy szárazra pároltuk, és kis térfogatu desztillált vízben oldtuk fel a desztillálási maradékot, vagy neutralizálás után közvetlenül egy kisméretű /0,5 x 4 cm/ DEAE-32 cellulóz oszlopon tisztítottuk tovább Moffatt eljárásának egyszerűsítésével (96).

3/ Az oszlopot 0,5 M trietilamin-bikarbonát pH 7,5-ös pufferrel való mosással HCO_3^- -ciklusra állítottuk be, majd desztillált vízzel mostuk. Az anyagrávitel után 50 mM trietilamin-bikarbonát pH 7,5 pufferrel történő mosással a még jelenlévő szennyeződések eluálódnak az

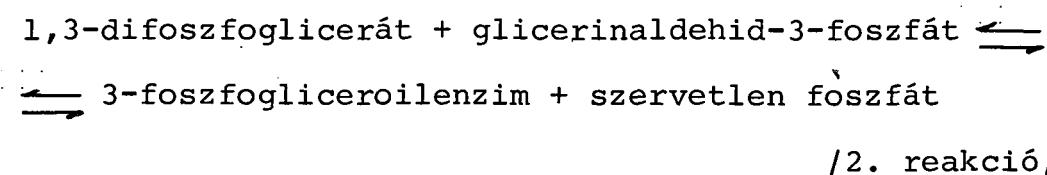
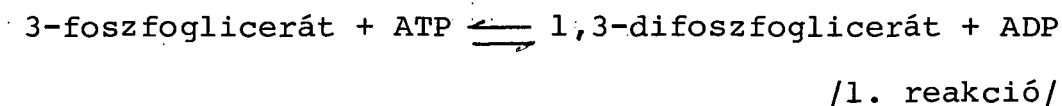
oszlopról. A ^{32}P -jelölt ATP eluciója 0,5 M trietilamin-bikarbonát /pH 7,5/ pufferrel történt. A néhány ml-ben eluálódó anyagot vákuumban rögtön bepároltuk, majd a trietilamint többszöri metanolos vagy etanolos bepárlással távolítottuk el. Végül az anyagot 1-2 ml vízben feloldottuk, neutralizáltuk, majd 50%-os alkoholos oldatban -20°C -on tároltuk.

A DEAE-cellulóz oszlopon történő tisztítási lépést a 2. ábrán tüntettük fel.

A preparátum tisztaságát PEI-cellulóz vékonyrétegen ellenőriztük (97), specifikus aktivitását kis aliquotjának OD_{259} és aktivitásmérésével a moláris extinkciós koefficiens ismeretében határoztuk meg.

β / Nagy specifikus aktivitású (γ - ^{32}P)ATP szintézise

Az eredeti, enzimatis reakciókon alapuló szintézist Glynn és Chapell dolgozta ki (98). A módszer lényege egy kicserélődési reakció szervesetlen foszfát és ATP terminális foszfát csoportja között, amely 3-foszfoglicerát kináz /1. reakció/, glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz /2. reakció/ és a megfelelő szubsztrátok között játszódik le:



Az eredeti módszert Maxam és Gilbert módosította (56), és a preparálás során az ő módszerüket követtük. A GAPDH enzimet 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM tris-HCl pH 8,0, 10 mM 2-MEA, 1 mM EDTA, 0,1 mM NAD^+ pufferrel szemben dializáltuk mikrodializálóban 5 órán át egyszeri puffer-cserével, míg a 3-PGK-t ugyanilyen, de NAD^+ nélküli pufferrel szemben, de 50 μl dializált GAPDH-t és 25 μl 3-PGK-t egyesítettünk, Eppendorf 3200 centrifugán lecentrifugáltuk, a csapadékot 75 μl kétszer desztillált vízben oldtuk, és felhasználásig jégen tartottuk.

25 mCi /2,7 nmól/ hordozómentes ^{32}P -ortofoszforsavat vákuumban szárazra pároltunk, majd desztillált vízzel kétszer ismételten bepároltuk /HCl eltávolítására/. A bepárlási maradékot az alábbi összetételű oldat 50 μl -ében oldtuk fel:

50 mM tris-HCl pH 8,0, 7 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 2 mM GSH, 1 mM Na-foszfoglicerát, 0,2 nM /10 nmól/ ATP.

3 μl dializált enzimkeveréket adtunk hozzá és szobahőmérsékleten reagáltattuk egy órán át. 250 μl desztillált víz, 5 μl 0,1 M EDTA hozzáadása után 5'-ig 90 °C-os vízfürdőn inaktiváltuk az enzimeket, majd lehűtés után 700 μl 95%-os alkoholt adtunk hozzá, és -20 °C-on tároltuk.

A konverzió mértékének a megállapítása úgy történt, hogy a preparátum kis aliquotját hideg ATP jelenlétében előkezelt PEI-cellulóz vékonyrétegen 0,75 M KH_2PO_4 -oldatban megfuttattuk (97), szárítás után a rétegcsíkot 1 cm-es darabokra feldaraboltuk, és aktivitásukat toluolos koktél-

ban mértük. A mért ^{32}P -aktivitási értékekből következtethettünk a konverzió mértékére, és ennek, valamint a bevitt ^{32}P mennyiségnek a figyelembevételével számítottuk ki a $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ specifikus aktivitását.

4/ T4 bakteriofág által indukált polinukleotid kináz aktivitásának mérése

Az aktivitásmérés /néhány módosítástól eltekintve/ Richardson módszerével történt (1). A mérés során $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ savoldhatatlan terméké alakulását mérjük. Az enzim egységét a következőképpen definiálták: 1E az az enzimmennyiség, amely 1 $\mu\text{mól}$ savoldhatatlan ^{32}P képződését katalizálja 37°C -on 30' alatt. A mért radioaktivitás értékek 0,05-0,5E tartományban arányosak az enzimkoncentrációval, ezért az enzimet 0,05 M tris-HCl pH 7,6, 0,5 mg/ml BSA, 0,01 M 2-MEA oldattal hígítottuk, hogy a lineáris tartományban végezhessük a mérést.

Az aktivitásméréshez a következő reakcióelegyet állítottuk össze /0,3 ml/ : 80 $\mu\text{mól}$ 5'-OH DNS /Micrococcus nukleázzal

emésztett borju timusz DNS/
0,066 mM $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ /specifikus aktivitás:
 5×10^6 cpm/ $\mu\text{mól}$ /

0,07 M tris-HCl pH 7,6

0,01 M MgCl_2

0,005M DTT vagy 0,01 M 2-MEA

0,05-0,5 E enzim /20 μl -ben/

37°C -on inkubáltuk a reakcióelegyet 30'-ig, majd 0,2 ml 2,5 mg/ml koncentrációjú hordozó DNS-t /borju timusz vagy

csirkevér DNS/ adtunk hozzá, és 0,5 ml hideg 10%-os TCA-val kicsaptuk a DNS-t. 2 ml desztillált víz hozzáadása után 5'-ig állni hagytuk, majd lecentrifugáltuk, és a DNS csapadékot 0,2 ml 0,2 N NaOH-ban feloldtuk erélyes rázogatás mellett. A 10%-os TCA-s kicsapást, centrifugálást, a csapadék újraoldását lugban megismételtük, majd a DNS-t ismét kicsaptuk 10%-os TCA-val, és Whatman GC/F üvegfilterre szűrtük. A filtereket 15-20 ml 2%-os, 0,02 M náatriumpirofoszfátot tartalmazó TCA-val, majd 1 ml alkohollal mostuk, infralámpa alatt megszáritottuk, és radioaktivitásukat toluolos koktéliban mértük.

5./ T4 fágindukált polinukleotid kináz tisztítása

A polinukleotid kinázt T4amN82 fágfertőzött *Escherichia coli* B sejtekből preparáltuk Richardson és Panet módszerének kombinálásával (1, 18).

A fágfertőzött baktériumsejteket kétlépéses kísérletben állítottuk elő. Az első lépésben a T4 amber fágot megfelelő szupresszor baktérium törzsön, *Ecoli* CR63-on elszaporítottuk. "G" táptalajon 0,6-0,7 optikai sűrűségig /550 nm-en mérve/ kinövesztettük a sejteket, és 4-es multiplicitással megfertőztük a faggal. További néhány órán át rázattuk sikrázóban 37 °C-on, majd néhány csepp kloroformot adtunk hozzá, és a sejttörmelékek lecentrifugálása után nyert fágglizátumot használtuk fel további sejtek fertőzésére.

A 2. lépésben *Escherichia coli* B baktérium törzset "G" táptalajon 2×10^9 sejt/ml sűrűségnél fertőztünk a T4amN82 fággal /sejtlizis nem következik be ebben az esetben/. További 2 órán át rázattuk a sejtkulturát 37°C -on, majd centrifugálás után a fágfertőzött sejteket fiziológiás sóoldattal mostuk, és -20°C -on tároltuk felhasználásáig.

Az enzimmtisztításhoz 23-25 g sejtből indultunk ki, amit alumínium oxiddal való eldörzsöléssel tártunk fel Panet szerint (18). 1 g sejthez 2 g alumínium oxidot adtunk, és eldörzsölés után 90-100 ml 0,05 M tris-HCl pH 7,6, 1 mM GSH pufferben szuszpendáltuk fel, lecentrifugáltuk $15000 \times g$ -n 10'-ig Beckman J-21 centrifugán, és kétszer extraháltuk 50-50 ml pufferrel. Végül optikai sűrűségét /260 nm-en/ 105-re állítottuk be.

A kivonatban levő nukleinsavakat a következő lépésben streptomycin szulfáttal kicsaptuk. Ebben a lépésben különíthető el egymástól a T4 fágindukált kináz, ligáz és DNS-polimeráz: a kináz és a DNS-polimeráz 0,7-0,8% streptomycin koncentrációnál a csapadékba kerül, míg a ligáz a felülszóban marad.

138 ml kivonathoz keverés közben 27,6 ml 5%-os streptomycin szulfát oldatot adtunk kb. 30' alatt (1). 15' további állás után lecentrifugáltuk $15000 \times g$ -n 10'-ig. A felülszóból fágindukált DNS ligázt preparáltunk (40), míg a csapadékot Teflon homogenizátorral 138ml 0,1 M kálium-foszfát pH 7,5, 0,002 M GSH pufferben szuszpendáltuk fel.

A tisztítás során a 3. lépés a felfuszpendált csapadék autolizise, amelynek során a jelenlévő endogén nukleázok a sejt DNS-tartalmát elbontják.

A streptomycines csapadék feloldása után nyert frakció 143 ml-éhez 0,43 ml 1 M MgCl_2 -ot adtunk, és 37°C -on inkubáltuk 1-2 órán át, mialatt az UV_{260} -abszorbeáló anyag 90-95%-a savoldhatóvá vált. Az autolizis követése Richardsonék módszerére alapján (99) úgy történt, hogy meghatározott időközönként 1 ml-es aliquotokat vettünk, és lecentrifugáltuk Janetzki K24-es centrifugán 10'-ig 15000rpm-en. A felüluszó optikai sűrűségét lemértük 0,05 M tris-HCl pH 7,4 pufferrel való megfelelő hígítás után. Kis részletét egyenlő térfogatú 1 N PCA-val kicsaptuk, a kicsapódó makromolekulák lecentrifugálása után a felüluszó optikai sűrűségét mértük.

Az autolizis után nyert szuszpenziót lehűtöttük 0°C -ra, lecentrifugáltuk, majd frakcionált $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapásnak vetettük alá. A felüluszó 130 ml-éhez 13 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adtunk kb. 30' alatt keverés közben. 20' további keverés után a csapadékot lecentrifugáltuk, a felüluszóhoz 25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adtunk 30' alatt. 20' után lecentrifugáltuk, és a csapadékot 0,01 M kálium-foszfát, 0,01 M 2-MEA pufferrel szemben dializáltuk egy éjszakán át.

A továbbiakban az enzimet DEAE-Sephadex A-50 oszlopon tisztítottuk, amelyet a dializáló pufferrel előzőleg equilibráltunk. Az anyag felvitele után az equilibráló pufferrel mostuk az oszlopot, míg az átfolyó anyag optikai sűrűsége 0,03 alá nem esett. A plinukleotid kinázt 0,1 M KCl-ot

tartalmazó 0,01 M kálium-foszfát pH 7,5, 0,01 M 2-MEA pufferrel eluáltuk. A DEAE-Sephadex kromatográfiás lépést a 3. ábrán szemléltetjük. Ebben a lépésben és a következő kromatográfiánál 0,1 mM ATP-t tartalmaztak az oldatok, ami védelmet nyújt az enzimnek az alacsony fehérje koncentrációnál bekövetkező inaktiválódással szemben.

Végül a polinukleotid kinázt foszfozellulóz oszlopon /1x10 cm/ tisztítottuk, amelyet 0,05 M kálium-foszfát pH 7,5, 0,01 M 2-MEA pufferrel mostunk az anyag felvitele előtt, majd 10-20 ml ugyanilyen oldattal az anyagfelvitel után, végül 0,05 M, 0,1 M és 0,25 M KCl-tartalmu kálium-foszfát pufferrel. Az enzim a 0,25 M KCl-tartalmu foszfát pufferrel eluálódik az oszlopról. A tisztított enzimet vagy ebben a pufferben, vagy 50% glicerint tartalmazó 0,02 M tris-HCl pH 7,5, 10 mM 2-MEA pufferben tároltuk -20 °C-on.

A tisztítás során a fehérjetartalmat Lowry módszerével (100), az enzim aktivitásának mérését Richardson módszerének módosításával végeztük (1). Az enzimmtisztítás adatait a 2. táblázatban tüntettük fel.

6./ Restrikciós endonukleázzal történő emésztéssel nyert DNS fragmentumok polinukleotid kinázos jelölése

A restrikciós emésztéssel nyert fragmentumok 5' végeit Wu és Kaiser módszerével defoszforiláltuk bakteriális alkálikus foszfatázzal (101). A reakcióelegy 0,2-0,8 mM /nukleotid

ekvivalensben kifejezett/ emésztett DNS-t, 100 mM tris-HCl-ot /pH 8,0/, 1 mM EDTA-t és 10-30 $\mu\text{g/ml}$ BAP-ot tartalmazott. Az emésztést 37 °C-on végeztük 60'-ig, majd a reakciót 20 mM EDTA-oldattal állítottuk le, más esetben 10 mM tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pufferrel telített fenollal inaktiváltuk a BAP-ot, majd ugyanilyen pufferrel szemben dializáltuk több napon át a fenol eltávolítására.

Az 5' végek foszforilálását ugyancsak Wu és Kaiser módszerével végeztük (101). A reakcióelegy /1 ml/ összetétele a következő volt: 0,12-0,3 mM BAP-pal kezelt DNS

70 mM tris-HCl pH 7,6

12 mM MgCl_2

10 mM 2-MEA

0,03 mM (γ - ^{32}P)ATP /spec. aktivitás: $1-4 \times 10^9$ cpm/ μmol /

30 egység polinukleotid kináz.

37 °C-on inkubáltuk 60'-ig, majd inaktiváltuk a kinázt hővel /5' 65 °C-on/ vagy 20 mM EDTA-val.

7./ DNS 5' terminális nukleotidjának meghatározása

A polinukleotid kinázos módszerrel in vitro jelölt DNS-t nukleozid-5'-monofoszfátokig hidrolizáltuk az alábbi módon: 1 ml 0,01 M tris-HCl pH 7,5, 0,01 M MgCl_2 oldatban oldtuk fel a DNS csapadékot, és 0,1 mg/ml pankreász DNáz-zal emésztettük 37 °C-on 60'-ig, majd 20 μl kigyó méreg foszfodiészterázt adtunk hozzá /5 mg/ml törzsoldatból/, és tovább folytattuk az emésztést 37 °C-on 60'-ig. A reakcióelegy vizsgálata PEI-cellulóz vékonyrétegen történt, amit

0,5 M LiCl-ban futtattunk jelöletlen nukleozid monofoszfát kontrollok alkalmazása mellett. Az UV₂₅₄-fényben láthatóvá vált foltokat kivágtuk, radioaktivitásukat toluolos koktéliban mértük (97, 101).

8. / pBR313 plazmid DNS preparálása

A Boyer és munkatársai által izolált (102) plazmidot tartalmazó baktérium sejteket B1 vitamin jelenlétében 2% caseinosavval és 0,5% glükózzal kiegészített "M9" táptalajon 0,8-1,0 OD₅₅₀ értékig növesztettük sikrázóban 37 °C-on. 170 γ/ml kloramfenikollal amplifikáltuk a plazmidot 12-16 órán át 37 °C-on folyamatos rázatás mellett Clewell eljárásának megfelelően (103). A sejteket Janetzki K70-es centrifugán 40-45'-ig 2500rpm-en kiülepítettük, majd 25% szaharóz, 50 mM tris-HCl pH 8,0-as pufferben szuszpendáltuk fel. /1 literből nyert sejteket 10 ml-ben/ 1/5tf. 5 mg/ml koncentrációju lizozimmal, majd 2/5tf. 250 mM pH 8,0-as EDTA-oldattal kevertettük 0 °C-on 5-5'-ig, ezután azonos térfogatu frissen készített 50 mM tris-HCl pH 8,0, 0,0625 M EDTA, 0,1% Triton X-100 oldattal lizáltuk a sejteket. Alapos össze-rázás után 15-20'-ig állni hagytuk a reakcióelegyet, ezt követően a kromoszómális DNS-t Beckman L2-65K ultracentrifugán a 42,1 rotorral 30'-ig 30000 rpm-en 2 °C-on, vagy Beckman J-21 centrifugán a JA-20-as rotorral maximális fordulatszámom lecentrifuáltuk. Az így nyert felüluszó /cleared lysate/ tartalmazza a plazmid DNS-t, amit kétféle-

képpen tisztítottunk tovább:

a./ 50 γ /ml DNáz-mentes RNáz-zal kezeltük 20 °C-on 1 órán át, majd 125 γ /ml proteináz-K-val fehérjementesítettük 2-3 órára 37 °C-on /a proteináz-K-t előzőleg 15'-ig 37 °C-on előemésztettük/. Fenolos extrakció és éteres kezelés után a DNS-t 0,1 tf. 20%-os kálium-acetát jelenlétében 2 tf. alkohollal kicsaptuk. Egy éjszakán át -20 °C-on állni hagytuk, majd centrifugálás után 10 mM tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pufferben oldtuk fel a DNS-t;

b./ Tisztább plazmid DNS preparátum nyerésére a cleared lysate-ot CsCl-etidium-bromid egyensúlyi gradiensen tisztítottuk Clewell és Helinski ill. Tanaka és Weisblum eljárásával (104, 105). A DNS mintát Beckman L2-65K ultracentrifugán 33000 rpm-en 8 °C-on centrifugáltuk 60 órán át. A bakteriális, kromoszómális DNS és a plazmid DNS azon az alapon választható el egymástól, hogy sűrűségük etidium-bromid hozzáadására különbözővé válik, így az etidium-bromidot tartalmazó sűrűség gradiensen különböző helyzetet foglalnak el. A supercoiled DNS UV₂₅₄-ben detektált csikját Büchler auto Densi-flow-val izoláltuk.

Az etidium-bromidtól izo-amilalkoholos extrakcióval szabadultunk meg, négyszer 2 tf. izo-amilalkohollal ráztuk, majd a vizes fázist 10 mM tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pufferrel szemben dializáltuk /CsCl eltávolítás árá/ (106). Pufferrel telített fenollal extraháltuk, és intenzíven dializáltuk 10 mM tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pufferrel szemben. A plazmid DNS pontos koncentrációját OD₂₆₀-méréssel, míg tiszta-

ságát 1%-os analitikai agaróz gélelektroforézissel határoztuk meg.

9./ DNS fragmentum izolálása agaróz gélből

A DNS fragmentumot Birnstiel módszerének megfelelően izoláltuk agaróz gélből. Éles pengével vagy orvosi szikével kivágtuk az UV-fényben detektált DNS fragmentumot tartalmazó csíkot, és apró darabokra vágás után 4 M KJ, 14 mM 2-MEA oldat megfelelő mennyiségében feloldtuk 45 °C-on. A DNS mennyiségétől függően megfelelő nagyságu hidroxilapatit oszlopra vittük rá, amit az anyagrávitel után több oszloptérfogat 4 M KJ, 14 mM 2-MEA oldattal mostunk az agaróz eltávolítására, majd több oszloptérfogat 10 mM nátrium-foszfát pH 6,7-es pufferrel való mosás után 0,4 M foszfát pufferrel eluáltuk a DNS fragmentumot (54). A foszfátot dializissel távolítottuk el, ezután a DNS-t 0,1 tf. 20%-os kálium-acetát jelenlétében 2 tf. alkohollal kicsaptuk. A DNS fragmentum viszszerése 30-40% között változott.

10./ ³²P-jelölt dupla szálu DNS fragmentum izolálása 12%-os poliakrilamid gélből

A 12%-os poliakrilamid gélelektroforézishez a következő komponenseket mértük össze:

30 ml 40%-os akrilamid-2%-os N,N'-metilén-biszakrilamid vizes oldat

4 ml 25X töménységű tris-acetát puffer /1M tris-HCl pH 7,8
0,5M Na-acetát
0,05M EDTA/

65 ml H₂O

750 µl 5%-os /NH₄/₂S₂O₈

75 µl TEMED;

Az elektroforézist 17x20x0,2 cm-es lapon 0,04M tris-HCl, 0,02M Na-acetát, 0,002M EDTA pH 7,8-as pufferben végeztük 30-40V-on 12 órán át. A gélről készült autoradiográfiás képhez Kodak RP Royal X-Omat /18x24 cm/ röntgenfilmet használtunk.

Az autoradiogram alapján a kérdéses DNS fragmentumot kivágtuk a gélből, 1 M NaCl-dal izoláltuk a DNS-t, és 40 γ/ml hordozó RNS jelenlétében alkohollal kicsaptuk.

11. / ³²P-jelölt DNS fragmentum izolálása 12%-os poliakrilamid gélből szárelválasztással (56)

Az 5' végén ³²P-vel jelölt DNS fragmentumot hővel denaturáltuk /5' 100 °C-on/, majd 50 µl 10% glicerin, 0,001 M EDTA, 0,05% xilén cianol FF, 0,05% brómfenolkék összetételű szárelválasztó oldatban vittük fel egy 12% akrilamid-0,4% N,N'-metilén-biszakrilamid, 50 mM tris-borát pH 8,3, 1 mM EDTA poliakrilamid lap gélre. Az elektroforézist 50 mM tris-HCl pH 8,3, 1 mM EDTA pufferben végeztük 4-5 órán át 150 V-on.

A szálelválasztást autoradiográfiával detektáltuk, majd az elkülönült DNS-szálakat kivágtuk a gélből, 1 M-os NaCl-dal izoláltuk a DNS-t, és a továbbiakban ugyanugy kezeltük, mint az előbbi kísérletben.

12./ A Maxam-Gilbert-féle bázis-specifikus reakciók kivitelezése (56)

Poliakrilamid gélből való izolálás után a DNS-t 0,3 M Na-acetát pH 6,7-os pufferben újraoldtuk, négy egyenlő részre osztottuk, 1-1 μ l ultrahangozott 10 mg/ml koncentrációjú borju timusz DNS-t adtunk hozzájuk, és ismételt alkoholos kicsapás után bázis-specifikus kémiai reakcióknak vetettük alá.

a/ G-specifikus reakció

A ^{32}P -jelölt DNS csapadékot 25 μ l kétszer desztillált vízben oldtuk, 250 μ l 0,05M pH 8,0-as Na-kakodilát puffert adtunk hozzá, alapos összekeverés után jégen lehűtöttük, majd 1 μ l tömény dimetilszulfáttal reagáltattuk 20 °C-on 30'-ig. A reakció leállítása a következő, 10x-es töménységű oldat 25 μ l-ével történt: 2,5M 2-MEA, 3M Na-acetát pH 7,5, 0,1M Mg-acetát, 0,1mM EDTA, 1,0 mg/ml tRNS. 900 μ l 95%-os alkohollal kicsaptuk a DNS-t, 10'-ig cseppfolyós levegőben tartottuk, majd Eppendorf 3200 centrifugán 10'-ig centrifugáltuk. A felülusztót elöntöttük, a DNS csapadékot pedig 300 μ l 0,3M Na-acetát pH 6,0-os pufferben újraoldtuk, majd 3 tf. alkohollal ismét kicsaptuk a DNS-t. Centrifugálás és

70%-os alkoholos mosás után a csapadékot exsikkátorban, vákuumban megszárítottuk.

A DNS lánchasítása frissen készített 1M piperidin oldattal történt. 20 μ l 1M piperidinben oldtuk a DNS-t, és kapillárisban inkubáltuk 40-45'-ig 90 °C-os vízfürdőben. A reakció végbemenetele után a kapilláris tartalmát 25 μ l kétszer desztillált vízbe fújtuk, exsikkátorban vákuumban megszárítottuk, majd 30-40 μ l vízzel ismét bepároltuk, hogy a piperidint tökéletesen eltávolítsuk.

b/ A₊/C₋-specifikus reakció

A 32 P-jelölt DNS csapadékot 25 μ l 1,2 N NaOH, 1,2 mM EDTA oldatban feloldtuk, és kapillárisba szivás után 90 °C-on inkubáltuk 20-30'-ig, majd 1N ecetsavval neutralizáltuk, és 2 μ l 40 mg/ml hordozó RNS jelenlétében 300 μ l 95%-os alkohollal kicsaptuk a DNS-t. Cseppfolyós levegőben 10'-ig állni hagytuk, majd lecentrifugáltuk. 70%-os alkoholos mosás után a DNS csapadékot 40-45'-ig inkubáltuk kapillárisban 20 μ l 0,5M piperidin oldatban 90 °C-on, majd a kapilláris tartalmát 25 μ l vízbe fújtuk, és ugyanugy kezeltük tovább, mint a G-specifikus reakcióelegyet.

c/ T₊/C₋-specifikus reakció

A DNS csapadékot 25 μ l kétszer desztillált vízben oldtuk, jégben lehűtöttük, majd 25 μ l tömény hidrazinnal reagáltattuk szobahőmérsékleten 30'-ig. Jégen lehűtöttük, és 250 μ l 0,3M Na-acetát pH 6,0, 0,01M Mg-acetát, 0,1mM EDTA, 0,1 mg/ml tRNS oldattal leállítottuk a reakciót. 900 μ l 95%-os alkohollal kicsaptuk a DNS-t, és a továbbiakban ugyanugy

kezeltük, mint a G-specifikus reakcióelegyet, kivéve, hogy a lánchasítás 0,5M piperidin oldattal történt.

d/ C-specifikus reakció

A jelölt DNS fragmentumot 15 μ l kétszer desztillált vízben oldtuk, 10 μ l 5M NaCl-ot adtunk hozzá, alaposan összekevertük, és lehűtés után 25 μ l tömény hidrazinnal reagáltattuk szobahőmérsékleten 30'-ig. A továbbiakban a DNS mintát ugyanugy kezeltük, mint a T-specifikus reakcióelegyet.

A 32 P-jelölt hasítási termékek vizsgálata 20%-os poliakrilamid /akrilamid-N,N'-metilén-biszakrilamid = 20 : 1/-8M karbamid 20x40x0,3 cm-es denaturáló gélen történt, 0,089M tris-borát pH 8,3, 0,025M EDTA pufferben 400V-on 14-18 órán át. A DNS mintákat 300 mg karbamid, 250 μ l 0,1N NaOH, 100 μ l festékelegy összetételű oldat 10-20 μ l-ében vittük fel a gélre. A festékelegy a következő komponenseket tartalmazta 70%-os szacharóz oldatban: Xilén cianol FF:20 mg/10 ml

Fluoreszcein	: 100 mg/10 ml
Tripán vörös	: 50 mg/10 ml
Brómfenolkék	: 20 mg/10 ml
Brómkrezolbibor	: 20 mg/10 ml
Eozin	: 100 mg/10 ml

Az autoradiográfiához AGFA röntgenfilmet használtunk. Az expozíciós idő 2-3 hét között változott. Az autoradiogramokról a fragmentumok szekvenciája közvetlenül leolvasható.

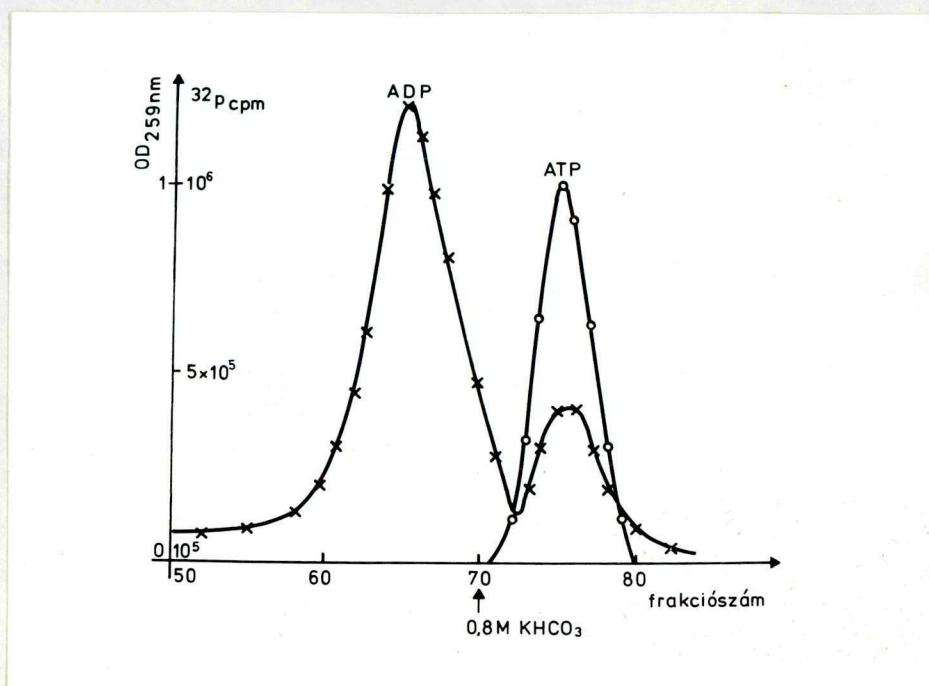
IV. KISÉRLETI EREDMÉNYEK, AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Specifikus DNS szakaszok vizsgálata során nagy specifikus aktivitású, 5'-végükön ^{32}P radioaktív jelölést tartalmazó DNS fragmentumokra volt szükségünk, amelyek egy, az irodalomból ismert in vitro foszforilálási technika alkalmazásával előállíthatók (1, 18).

I. Első feladatunk ennek az in vitro jelölési technikának a beállítása volt, amely T4 bakteriofág által indukált polinukleotid kináz és $\gamma\text{-}^{32}\text{P}/\text{ATP}$ felhasználásán alapszik. A polinukleotid kináz enzimet T4amN82 fágfertőzött *Escherichia coli* B baktérium sejtekből állítottuk elő az irodalomban leírt módszerek kombinálásával (1, 18). Az enzim aktivitásának méréséhez szükséges szubsztrátokat: 5'-végén szabad hidroxil csoportot tartalmazó DNS-t /*Micrococcus* nukleázal fragmentált/ és $\gamma\text{-}^{32}\text{P}/\text{ATP}$ -t mi magunk állítottunk elő, néhány módosítástól eltekintve, az irodalmi módszerek felhasználásával. $\gamma\text{-}^{32}\text{P}/\text{ATP}$ -t fotoszintetikus foszforilálással (94), ill. egy enzimatikus szintézis (98) módosításával állítottuk elő (56). A fotoszintetikus foszforilálással előállított preparátumot Dowex 1 anioncserélő gyantán, majd DEAE-cellulóz oszlopon tisztítottuk tovább. A kromatográfiás tisztítási lépéseket az 1. és 2. ábrán tüntettük fel. Kromatográfiásan egységes jelzett preparátumot nyertünk, amelynek a specifikus aktivitása $1\text{-}5 \times 10^9$ cpm/ μmol /0,45-2,3 Ci/mmól/ között változott. Az ilyen specifikus akti-

vitásu preparátum az enzim aktivitásának mérésén kívül számos feladat megoldására alkalmasnak bizonyult, de szekvenciázási célokra már nem volt megfelelő. Az eredeti, Glynn-Chapell-féle enzimatis reakciókon alapuló szintézist (98) A. Maxam és W. Gilbert módosította, és magas specifikus aktivitásu preparátum nyerésére mi ez utóbbi eljárást követtük (56). Mivel a szintézist csak jó minőségű, tiszta, hordozómentes ^{32}P -vel lehetett kivitelezni /ami ritkán állt rendelkezésünkre/, ezért további módosításokra volt szükség, hogy a kereskedelemben kapható ^{32}P -izotóp felhasználásával megfelelő specifikus aktivitásu ATP-t preparálhassunk. Ezek a módosítások a következők voltak: a reakcióhoz felhasznált ^{32}P -ortofoszforsav mennyiségét- csökkentettük, 25 mCi helyett maximálisan 10 mCi-t vittünk be /hideg ortofoszforsav hozzáadásával biztosítottuk, hogy a foszfát mennyisége molárisan megfelelő legyen/, A bepárlási maradékot 250 μl 50 mM tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 2 mM GSH, 1 mM Na-foszfoglicerát, 0,2 mM ATP oldatban oldtuk fel, amely emellett még 25 μM NAD^+ -ot is tartalmazott. /A bevitt hideg ATP mennyisége tehát jelen esetben 50 nmól, ami nyilvánvalóan csökkenti a specifikus aktivitást./ A reakcióhoz dupla mennyiségű enzimet használtunk fel. Ezekkel a módosításokkal elérhető specifikus aktivitás 120-150 Ci/mmól, míg a Maxam-Gilbert-féle szintézissel rutinszerűen elérhető specifikus aktivitás 1000-1500 Ci/mmól.

Visszatérve a T4 fágindukált kináz preparálására, az enzimet a fágfertőzött sejtek feltárása, streptomícines kicsapás, autolízis, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os frakcionálás után DEAE-Sephadex és foszfocellulóz oszlopon tisztítottuk. A DEAE-Sephadex kromatográfiás lépést a 3. ábrán, míg az enzimtisztítás adatait a 2. táblázatban tüntettük fel. Mintegy 1000-szeresére tisztítottuk az enzimet, és mivel az ellenőrző kísérletek szerint szennyező nukleázok, alkálikus foszfatáz vagy DNS-ligáz jelenlétét nem tudtuk kimutatni, további enzimtisztítási lépéseket nem tartottunk szükségesnek.



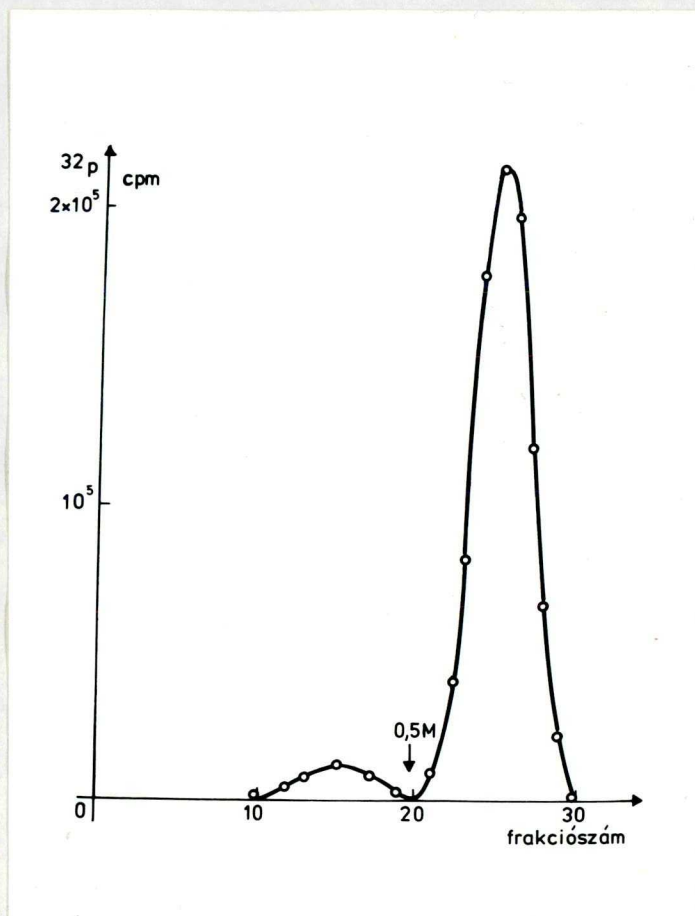
1. ábra

γ -³²P/ATP tisztítása Dowex 1 anioncserélő oszlopon

x—x—x OD_{259nm} /optikai sűrűség 259 nm-en mérve/

o—o—o ³²P-radioaktivitás /cpm/ Cserenkov effektussal mérve

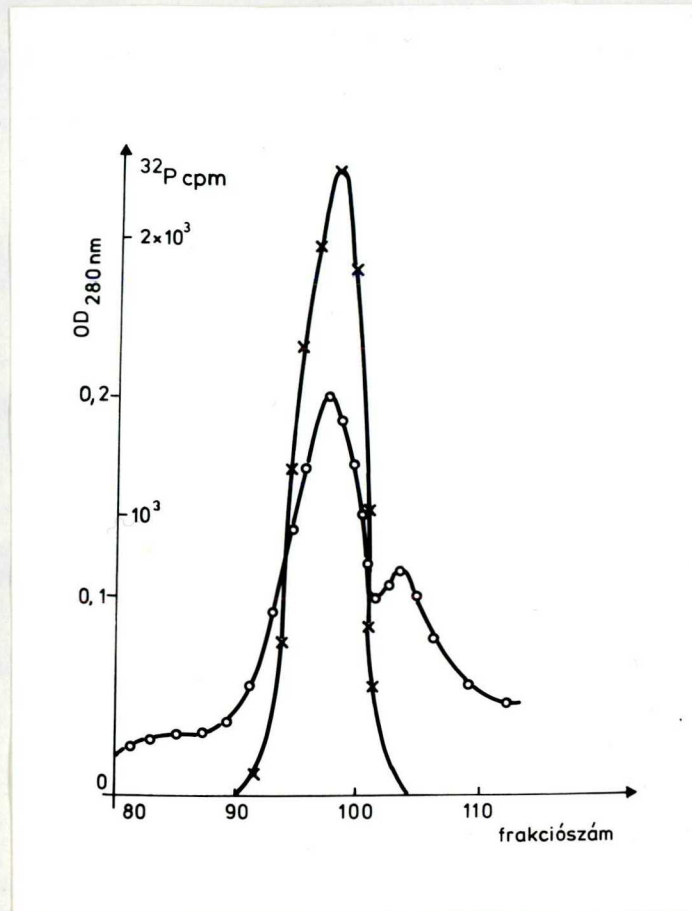
A fotoszintetikus foszforilálással ADP-ből és ³²P-ortofoszfátból spenót kloroplaszt preparátum felhasználásával előállított (⁹⁴) γ -³²P/ATP-t egy Dowex 1 HCO₃⁻-ciklusú, 200-400 mesh szemcsenagyságu anioncserélő gyantából készített 0,5x5 cm-es oszlopra vittük, 0,2 M, majd 0,4 M-os KHCO₃-oldattal mostuk a fölös mennyiségű jelzett szervetlen foszfát és ADP eltávolítására, majd 0,8 M KHCO₃-oldattal eluáltuk a jelzett ATP-t. Az aktív frakciókat egyesítettük, és fölös mennyiségű H-ciklusú Dowex 50W kationcserélő gyantával K⁺-mentesítettük.



2. ábra

γ - ^{32}P /ATP tisztítása DEAE-cellulóz oszlopon

A Dowex 1 oszlopon tisztított jelzett ATP preparátumot DEAE-32 cellulóz oszlopon tisztítottuk tovább /oszlopméret: 0,5x4 cm/. 0,5M trietilamin-bikarbonát pH 7,5-ös pufferrel való mosással HCO_3^- -ciklusra állítottuk be az oszlopot. Az anyagrávitel után 30-40 ml 50 mM pH 7,5-ös trietilamin-bikarbonát pufferrel történő mosás következett, majd 0,5 M trietilamin-bikarbonát pufferrel eluáltuk a γ - ^{32}P /ATP-t. Az aktív frakciókat /6 ml/ egyesítettük, vákuumban szárazra pároltuk. A trietilamint többszöri metanolos vagy etanolos bepárlással távolítottuk el. A bepárlási maradékot 1,5-2 ml vízben oldtuk, OD_{259} - és aktivitásmérés után 50%-os alkoholos oldatban tároltuk -20°C -on a jelzett preparátumot.



3. ábra

T4 fágindukált polinukleotid kináz tisztítása DEAE-
Sephadex oszlopon

x—x—x ³²P radioaktivitás filteren mérve

o—o—o OD_{280nm} optikai sűrűség 280 nm-en mérve

Az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapás után nyert enzimfrakciót 0,01M kálium-foszfát, 0,01M 2-MEA pH 7,5-ös pufferrel szemben dializáltuk egy éjszakán át, majd ugyanilyen pufferrel equilibrált DEAE-Sephadex A-50 /2x40cm/ oszlopra vittük /280mg fehérje, 87000 egység összaktivitás/. Az oszlopot az equilibráló pufferrel mostuk, míg az átfolyó anyag OD-je kb. 0,03 nem volt. 0,1M KCl-ot tartalmazó 0,01M kálium-foszfát, 0,01M 2-MEA pH 7,5-ös pufferrel eluáltuk a polinukleotid kinázt. Az enzim aktivitását a kísérleti részben leírt módon mértük.

2. táblázat

T4 fágindukált plinukleotid kináz tisztítási adatai

Tisztítási lépések	A teljes aktivitás / egység /	Fehérjetartalom / mg /	Specifikus aktivitás / egység/mg /
I. Feltárás után nyert extraktum	72000	2100	34
II. Streptomycines kicsapás	60000	1300	46
III. Autolizis	91000	710	128
IV. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os frakcionálás	87000	280	310
V. DEAE-Sephadex kromatográfia	39000	5	8000
VI. Foszfocellulóz kromatográfia	27000	0,8	33750



II. Laboratóriumunkban Kiss Antal *Bacillus sphaericus*-ből izolált egy új restrikciós endonukleázt, a BspR-t. Az enzim gyakorlati szempontból rendkívül fontos tulajdonsága, hogy a baktérium törzsben a Bsp-R szint rendkívül magas, másrészt már a kezdeti tisztítási lépések után igen alacsony az exonukleáz tartalma. Nagy mennyiségben preparálható és homogenitásig tisztítható enzim (7). Különböző DNS molekulákra gyakorolt hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy ϕ X174 RFI DNS-en ugyanolyan gélelektroforetikus képet nyertünk, mint amilyent HaeIII enzimre közöltek (107). Vizsgálataink során a Bsp hasítási specifitását összehasonlítottuk HaeIII-éval és az izoschizomerével, BsuR-éval (108). A három fragmentációs mintázat azonos volt, amiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Bsu, Bsp és HaeIII azonos szekvenciát ismer fel. Bron és Murray, valamint Murray és Morrison közvetlen szekvenciázási módszerekkel meghatározták a Bsu és a HaeIII enzim felismerő szekvenciáját (108), és azt tapasztalták, hogy a felismerő szekvencia mindkét enzimnél 5'--NGCCN--, és a hasítás a központi GC nukleotidok között következik be. A restrikciós enzimek hasítási szekvenciájának megállapításában hasznos segédeszköz a T4 fágindukált kinázzal végzett in vitro foszforilálási reakció, és a Bsp hasítási szekvenciájának megállapításában mi is felhasználtuk ezt a módszert.

Jelöletlen T7 bakteriofág DNS-t BspR-vel tökéletesen megemésztettünk /az emésztés teljességét 1%-os agaróz

gélelektroforézissel ellenőriztük (85). A nyert fragmentumok 5'-végeit bakteriális alkálikus foszfatázzal defoszforiláltuk, majd polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-vel Wu és Kaiser szerint (101) megjelöltük. A γ - ^{32}P /ATP feleslegét Sephadex G-50 kromatográfiával távolítottuk el /részletesebben lásd a III. pontban/. A kizárási térfogatban eluáló DNS-t pankreász DNáz-zal és kigyó mérgefoszfodiészterázzal az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon mononukleotidokig emésztettük, és jelöletlen dezoxinukleozid monofoszfátokkal együtt vizsgáltuk előkezelt PEI-cellulóz vékonyrétegen. Az UV-fényben detektált foltok radioaktivitását lemértük, és az alábbi eredményt kaptuk:

	dAMP	dGMP	dCMP	TMP
Radioaktivitás	115	122	2138	102
/cpm/				

A radioaktivitás szinte teljes mértékben a dCMP foltjában jelentkezett, ami azt mutatta, hogy CMP a terminális nukleotid. Ez megerősíti, hogy a Bsp-nek ugyanaz a felismerő szekvenciája, mint a HaeIII-nak és a BsuR-nak, de nem ad elég információt arra nézve, hogy a két lehetséges hasítási hely közül melyiknél következik be a hasítás:



III. A polinukleotid kinázos jelölési módszert felhasználtuk a csoportban izolált új restrikciós endonukleáz, BspR által előidézett hasítások számának a meghatározására. Szubsztrátként ^3H -timidinnel jelölt λ imm434ct68S7 fág DNS-t használtunk fel. Kontrollként két kísérletet végeztünk el:

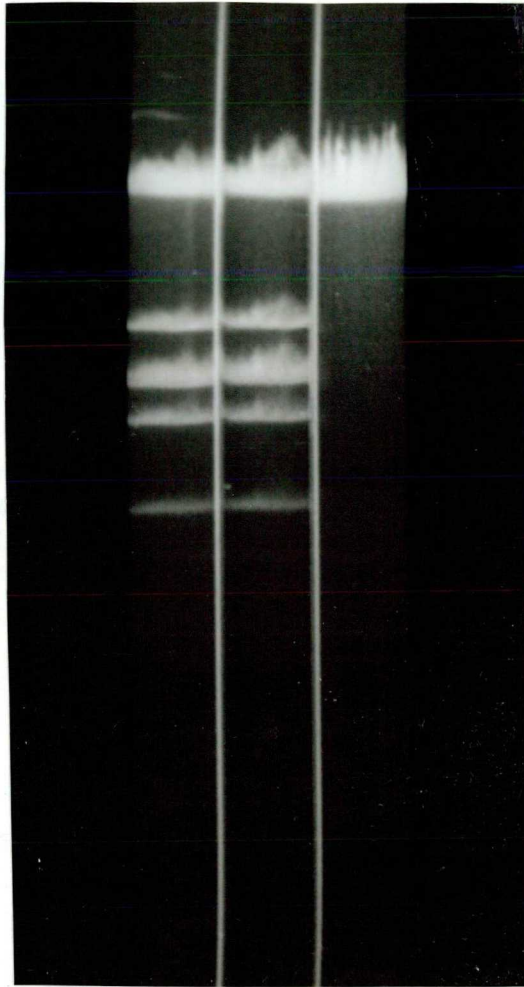
1./ ^3H - λ -DNS-t bakteriális alkálikus foszfatázzal defoszforiláltunk, majd a plinukleotid kinázos módszerrel in vitro megjelöltünk (102). A ^3H - λ - ^{32}P /ATP feleslegét Sephadex G-50 gélszűréssel távolítottuk el. Ez kezdetben igen komoly nehézséget jelentett, mivel a ^{32}P -jelölt ATP rendkívül erősen kötődött a DNS-hez, és így a kizárási térfogatban ^{32}P -vel erősen átszennyezve eluálódott a DNS, ami miatt az eredmények hamisak és reprodukálhatatlanok voltak. Ezen a problémán úgy segítettünk, hogy a kinázos reakcióelegyhez 7M végkoncentrációban karbamidot és 3 mM hideg ATP-t adtunk, és az egész gélszűrést 7M karbamid jelenlétében végeztük. Az eluáló frakciók ^3H ill. ^{32}P -aktivitását folyamatosan mértük a kromatográfia során. A kizárási térfogatban eluáló DNS frakciókat egyesítettük, és aliquotjait hordozó DNS jelenlétében 10%-os TCA-val kicsaptuk. Filterre szűrtük a csapadékot, 5%-os TCA-val, majd alkohollal mostuk és a filterek aktivitását toluolos koktéltban mértük. A filteren mért ^3H ill. ^{32}P radioaktivitási értékekből a felhasznált ^3H - λ - ^{32}P /ATP és ^3H - λ -DNS specifikus aktivitásának ismeretében következtettünk az 5'végek számára.

2./ ^3H - λ -DNS-t EcoRI restrikciós enzimmal emésztettünk, míg az emésztés teljessé nem vált. /lásd 4. ábra/. A nyert fragmentumok 5'végeit BAP-pal defoszforiláltuk, majd polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-vel foszforiláltuk. A DNS-t Sephadex G-50 oszlopon izoláltuk hasonló módon, mint az előző kísérletben. A kísérletek eredményét a 3. táblázatban tüntettük fel.

Az a/ kísérletben a vártak megfelelően 2 terminális véget kaptunk, ami egyértelműen igazolja egyrészt azt, hogy a használt DNS homogén volt, kimutatható mennyiségben nem tartalmazott egyszálu töréseket, másrészt a felhasznált enzimek sem idéztek elő töréseket a DNS-ben az emésztések során. Bsp-emésztés előtt egy másik restrikciós endonukleázos emésztéssel, EcoRI-gyel nyert λ -DNS fragmentumok számát is meghatároztuk. Az EcoRI enzim a λ -DNS-t 5 helyen hasítja, és így 6 fragmentumot eredményez /13,7, 4,74, 3,73, 3,48, 3,02 és 2,13 millió dalton fragmentumokat/, ami 12 terminális véget jelent. A kísérlet során 10 terminális véget kaptunk, ugyanis a 13,7 és a 2,13 millió dalton fragmentum könnyen összekapcsolódik egy 15,83 millió dalton DNS fragmentumot képezve /a ragadós végek összekapcsolódnak/, ami csökkenti eggyel a fragmentumok, és így kettővel a terminális végek számát. Ezt figyelembe véve a kapott eredmény megfelel a vártak, ami szintén megerősíti, hogy a DNS nem tartalmaz kimutatható mennyiségű egyszálu törést.

Ezek után rátérnénk a BspR emésztéssel ^3H - λ -DNS-ből nyert fragmentumok számának meghatározására.

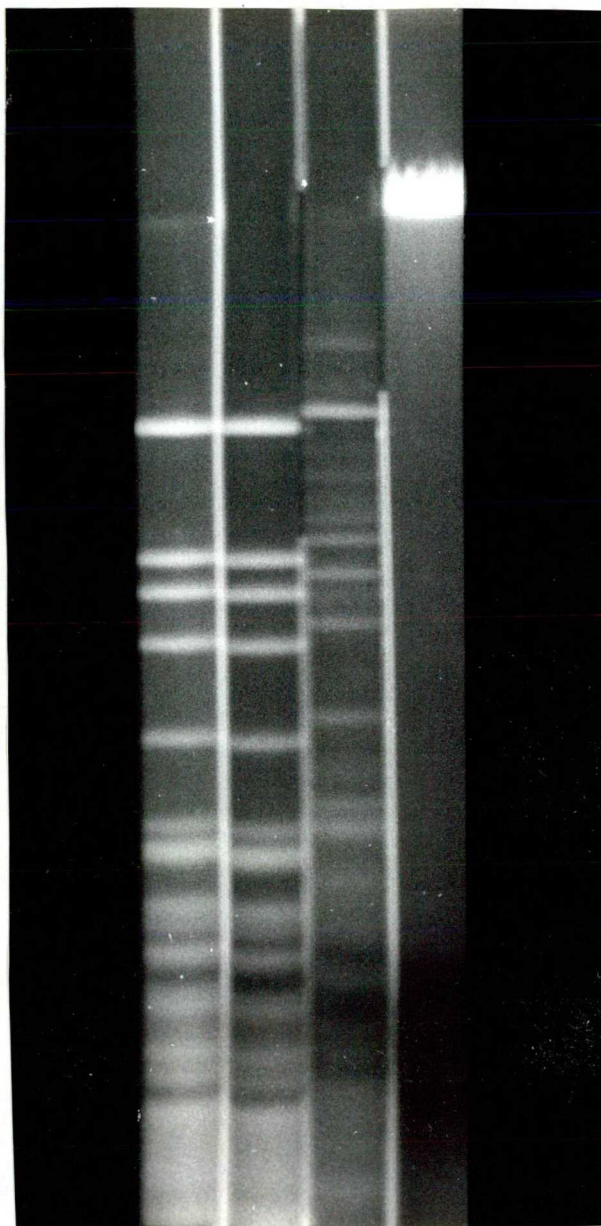
^3H - λ -DNS-t BspR-vel tökéletesen megemésztettünk /lásd 5. ábra/, 5'végeit BAP-pal defoszforiláltuk, majd polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-vel megjelöltük. A jelzett ATP feleslegét ugyancsak Sephadex G-50 kromatográfiával távolítottuk el. /lásd 6. ábra/ A BspR emésztéssel nyert fragmentumok számát ugyanugy határoztuk meg, mint a kontroll kísérletekben. Mint a 3. táblázat mutatja 250 terminális véget kaptunk, aminek alapján a dupla szálu DNS fragmentumok száma 125-nek adódott.



4. ábra

³H-λ-DNS emésztése EcoRI restrikciós enzimmel

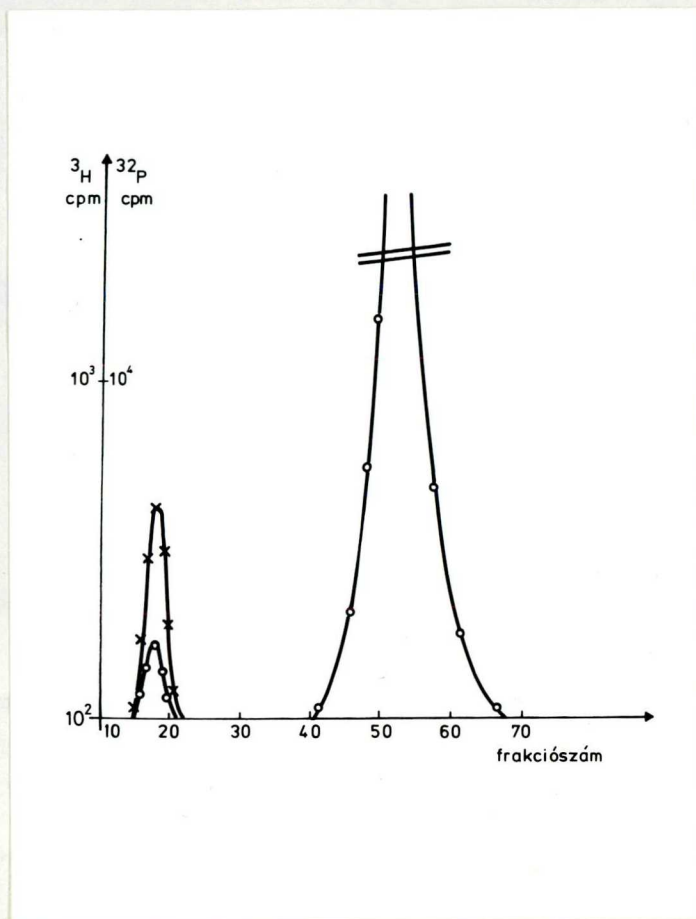
400 µl-es térfogatban 150 µg ³H-λ434ct68S7-DNS-t /specifikus aktivitás: 5500 cpm/µg /100 mM tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ pufferben 150 µl EcoRI restrikciós enzimmel emésztettünk 37 °C-on. 1 és 2 órás emésztés után a reakcióelegy kis aliquotjához 1/5 térfogat 50% szaharóz, 0,2M EDTA, 0,1% brómfenolkék oldatot adtunk, és az emésztést 1%-os analitikai gélelektroforézissel vizsgáltuk Helling módszerével (84). Jobbról balra haladva az 1. gél emésztetlen λ-DNS-ről készült felvételt, a 2. gél az 1 órás, míg a 3. gél a 2 órás emésztés után nyert képet mutatja.



5. ábra

^3H - λ -DNS emésztése Bsp R restrikciós enzimmel

100-150 μg ^3H - λ 434ct68S7-DNS-t /specifikus aktivitás: 5500 cpm/ μg / 10 mM tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10 mM MgCl_2 pufferben emésztettünk fölös mennyiségű Bsp R-val 37 °C-on. 1,2 és 3 órás emésztés ut-án a reakcióelegy kis aliquotját vizsgáltuk 1%-os agaróz gélen. Jobbról balra haladva az 1. gél emésztetlen λ -DNS-t, a 2. gél 1 órás, a 3. gél 2 órás, a 4. pedig 3 órás emésztés után nyert képet mutat. /A gélelektroforetikus kép alapján már 2 óra után tökéletes λ restrikciós enzimes emésztés./



6. ábra

Bsp R-emésztással nyert, ^{32}P -vel jelölt λ -fragmentumok
izolálása Sephadex G-50 oszlopon

x—x—x ^3H radioaktivitás /cpm/
 o—o—o ^{32}P radioaktivitás /cpm/

100-150 μg ^3H - λ -DNS-t /specifikus aktivitás: 5500 cpm/ μg /
 fölös mennyiségű Bsp R-vel megemésztettünk. Az 5'végeket a ki-
 sérleti részben leírt módon, Wu és Kaiser módszerével de-
 foszforiláltuk (101), majd polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-
 vel megjelöltük. A fölös mennyiségű jelzett ATP-t 1x35 cm-es
 Sephadex G-50 oszlopon távolítottuk el. A gélszűrést 7M karba-
 mid jelenlétében végeztük. A kizárási térfogatban eluáló
 ^3H - λ -DNS kis aliquotjait hordozó DNS jelenlétében 10%-os TCA-
 val kicsaptuk, filterre szűrtük, 5%-os TCA-val, majd alkohollal
 mostuk, és szárítás után a filterek radioaktivitását taluolos
 koktélban mértük.

3. táblázat

BspR restrikciós enzimmel nyert λ -DNS fragmentumok számának meghatározása

Szubsztrát	$^3\text{H}/\text{cpm}/$	DNS-be beépült $^{32}\text{P}/\text{cpm}/$	$^3\text{H}-\lambda\text{-DNS}$ $/\mu\text{mól}/$	Beépült $^{32}\text{P}/\text{ATP}$ $/\mu\text{mól}/$	$^3\text{H} / \text{P}$	5'végek száma
I. Alkálikus foszfatázzal kezelt $^3\text{H}-\lambda\text{-DNS}$	15900	470	9,636	$1,94 \times 10^{-4}$	50000	2
II. Alkálikus fosz- fatázzal kezelt, EcoRI-gyel emésztett $^3\text{H}-\lambda\text{-DNS}$	10855	866	6,58	$6,984 \times 10^{-4}$	9420	10
III. Alkálikus foszfatázzal kezelt, BspR- vel emésztett $^3\text{H}-\lambda\text{-DNS}$	8299	9605	5,0297	$1,264 \times 10^{-2}$	398	250



IV. Kutatócsoportunk évek óta foglalkozik a rRNS szintézis regulációjának tanulmányozásával *Escherichia coli*-ban, ezen belül a rRNS szintézisért felelős DNS szakaszok, /rDNS/ vizsgálatával. A munka célja, hogy megértsük a regulációban szerepet játszó elemek /promoter, terminátor stb./ szerkezete és funkciója közötti összefüggést. Ennek egyik megközelítési módjaként λ rif^d18 fág DNS-ből a genetikai rekombináció módszereivel klónoztuk a rDNS gént (109). Részletes fizikai térképezési vizsgálatok és RNS-polimeráz kötési kísérletek alapján a klónból izoláltuk azt a fragmentumot, ami nagy valószínűséggel tartalmazza a promotert, és megkezdtük a Maxam-Gilbert technika alkalmazásával ezen régió szekvenciájának megállapítását. Ez a munka jelenleg is folyamatban van, eredményei még további vizsgálatra szorulnak.

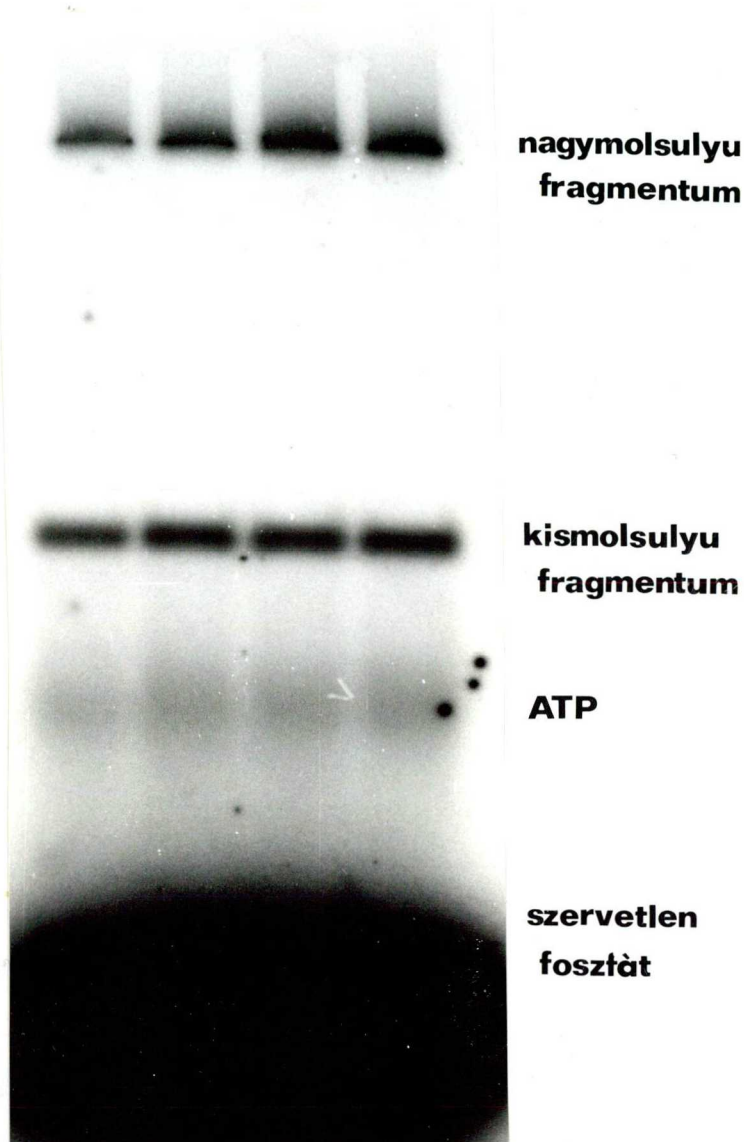
Ezzel egyidőben elkezdtük egy pBR313 elnevezésű plazmid DNS egy kis restrikciós fragmentumát szekvenciázni. Ezt a pBR313 elnevezésű plazmidot Boyer és munkatársai izolálták (102). A rekombináns DNS technológiában kiterjedten használt vektor, amely ampicillin és tetraciklin rezisztencia markereket /Ap^r, Tc^r/ hordoz, és Col El típusu replikációval rendelkezik. Kis mennyiségben, tisztán előállítható. Exponenciálisan növekvő baktérium kultúra 20-30 plazmid molekulát tartalmaz sejtenként, ha azonban a kromoszómális DNS replikációját pl. kloramfenikollal gátoljuk /a fehérjeszintézis inhibitora/,

sejtenként 2-300 plazmid molekula halmozódik fel, és az amplifikáció végén a sejt össz DNS tartalmának 40-50%-a a plazmid DNS. A plazmidot 13 restrikciós enzimmel jellemezték, így elég részletes fizikai térkép állt rendelkezésünkre. A pBR313 plazmid DNS HindIII-EcoRI fragmentumára esett választásunk, ugyanis ez a fragmentum a restrikciós hasítási térkép adatai alapján kb. 20000 dalton nagyságu, ideális szekvenciázási célokra, másrészt szekvenciája még nem ismeretes. A fő ok azonban, ami mellette szólt az, hogy irodalmi adatok alapján a HindIII hasítási hely valószínűleg a regulátor régióban található, promoter az *Escherichia coli* RNS-polimeráz számára. Másrészt, a HindIII-hasítási hely a pBR313 plazmid DNS-ben RNS-polimeráz jelenlétében védhető restrikciós emésztéssel szemben (110).

pBR313 plazmid DNS-t az irodalomban leírt módszerek alapján tisztítottunk (103-106). Hind III restrikciós enzimes emésztéssel linearizáltuk a plazmidot, majd a HindIII fragmentumot preparatív cilindrikus agaróz gélelektroforézissel izoláltuk a laboratóriumunkban kidolgozott berendezés felhasználásával. Ennek a tisztítási lépésnek az volt a célja, hogy az alacsony molekulasúlyú szennyeződésektől megszabaduljunk, ugyanis a polinukleotid kinázos jelölés során ezek is jelölődtek volna, ami megnehezítette volna az autoradiogram kiértékelését. A DNS fragmentumot Birnstiel módszerének megfelelően (54) izoláltuk az agaróz gélből. A továbbiakban két stratégiát követtünk:

- 1./ A HindIII fragmentumot polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-vel megjelöltük, majd EcoRI restrikciós enzimmel emésztettük. Az EcoRI enzim egy helyen hasítja a plazmid DNS-t, és egy nagy mólsúlyu, valamint egy kb. 20000 dalton nagyságu fragmentum keletkezik. A fragmentumokat 12%-os lap poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el. A gélről készült autoradiogramot a 7. ábra szemlélteti. A nagy mólsúlyu fragmentum a gél tetején marad, míg a kis mólsúlyu a brómfenolkék festékmárka fölött fut. A kis fragmentum alatti folt a jelzett ATP-nek, míg az alsó, nagyon intenzív folt a szervetlen foszfátnak felel meg. A kis fragmentumot izoláltuk a gélből, és a Maxam-Gilbert-technika alapján meghatároztuk a szekvenciáját. A gélről készült autoradiogramot a 8. ábra mutatja.
- 2./ A HindIII fragmentumot először megemésztettük EcoRI-restrikciós enzimmel, ezután jelöltük a keletkezett fragmentumokat polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-vel. A jelölt DNS fragmentumokat denaturáltuk, majd 12%-os poliakrilamid gélen szálalválasztást végeztünk a kísérleti részben leírt módon. A gélről készült autoradiogramot a 9. ábra szemlélteti. Az alsó két csík a képen a szétvált DNS száalaknak felel meg, míg a felettük levő halvány csík dupla szálú DNS fragmentum jelenlétét mutatja /nem volt egészen tökéletes a szálalválasztás./. A DNS száalakat izoláltuk a gélből, és mindkét szál szekvenciáját meghatároztuk a Maxam-Gilbert módszerrel.

A reakcióelegyeket ugyanazon a gélen futtattuk meg.
A gélről készült autoradiogramot a 10. ábra mutatja,
amelyről a szekvencia közvetlenül leolvasható.

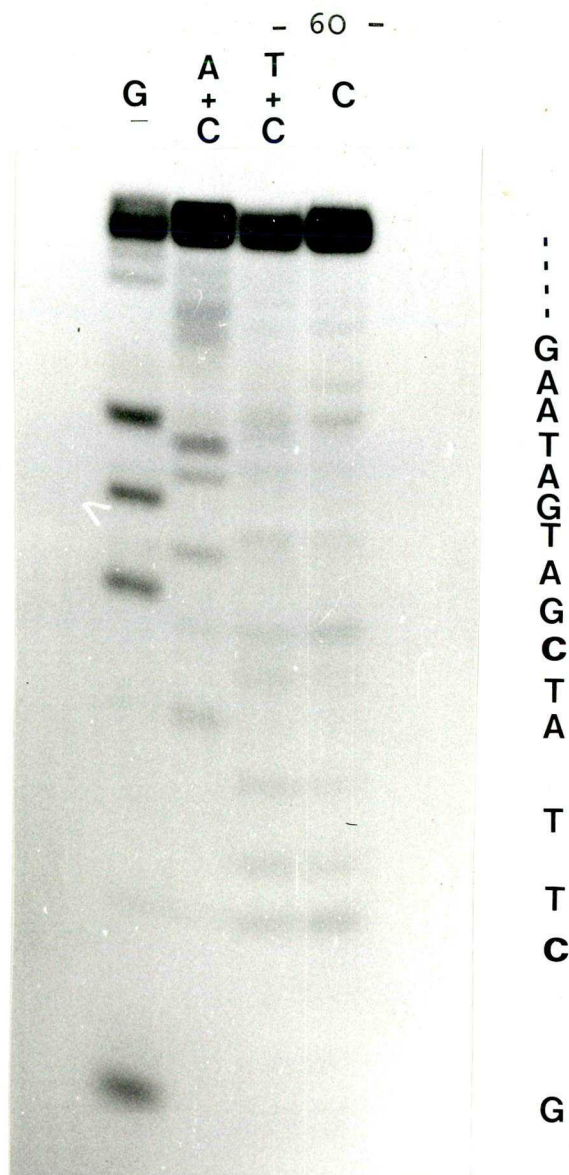


7. ábra

pBR313 plazmid DNS 32 P-jelölt HindIII-EcoRI frag-
mentumának izolálása 12%-os poliakrilamid gélen

1,2-1,5mg pBR313 plazmid DNS-t preparatív méretben 37 °C-on emésztettünk 0,3ml HindIII enzimmal, míg teljes emésztést nem kaptunk. A restrikciós enzimes emésztést 1%-os agaróz gélelektroforézissel követtük. A HindIII fragmentumot 2x20cm-es 1%-os preparatív cilindrikus agaróz gélelektroforézissel izoláltuk. A gélelektroforézist 30-40V-on végeztük 50mM tris-HCl pH 8,1, 20mM Na-acetát, 2 mM EDTA, 20mM NaCl pufferben egy éjszakán át. A HindIII fragmentumot Birnstiel módszerének megfelelően nyertük ki az agaróz gélből (54).

Kb. 150 µg HindIII fragmentumot Wu és Kaiser módszerének megfelelően defoszforiláltunk (101), majd polinukleotid kinázzal jelöltünk. EcoRI restrikciós enzimmel emésztettük, a reakciót 1/5 térfogat 50% szaharóz, 0,2M EDTA, 0,1% brómfenolkék oldattal állítottuk le. A ^{32}P -jelzett fragmentumokat 12%-os poliakrilamid gélen választottuk el az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon. A gélről készült autoradiogram alapján a kis méretű ^{32}P -jelölt HindIII fragmentumot kivágtuk a gélből, és 1M NaCl oldattal izoláltuk a DNS-t. 40 µg/ml hordozó RNS jelenlétében alkohollal kicsaptuk a DNS-t, és egy éjszakán át -20°C -on tartottuk.



8. ábra

pBR313 plazmid DNS HindIII-EcoRI fragmentumának szek-
venciája

A ^{32}P -jelölt DNS fragmentum elköhölös csapadékát 2ml 0,3M Na-acetát /pH 6,0/ pufferben feloldtuk, négy egyenlő részre osztottuk, 1-1 μl 10mg/ml ultrahangozott borju timusz hor-
dozó DNS jelenlétében alkohollal ismét kicsaptuk. Az Anyagok és módszerek fejezetben leirt módon bázis-specifikus kémiai reakciókat végeztünk, amajd a jelzett fragmentumokat 20%-os poliakrilamid-8M karbamid gélen választottuk szét.

/Cserenkov effektussal mérve 50000cpm radioaktivitást tartalmazó jelzett DNS-ből indultunk ki/ Az expozíciós idő két hét volt.



dupla szàlu
DNS

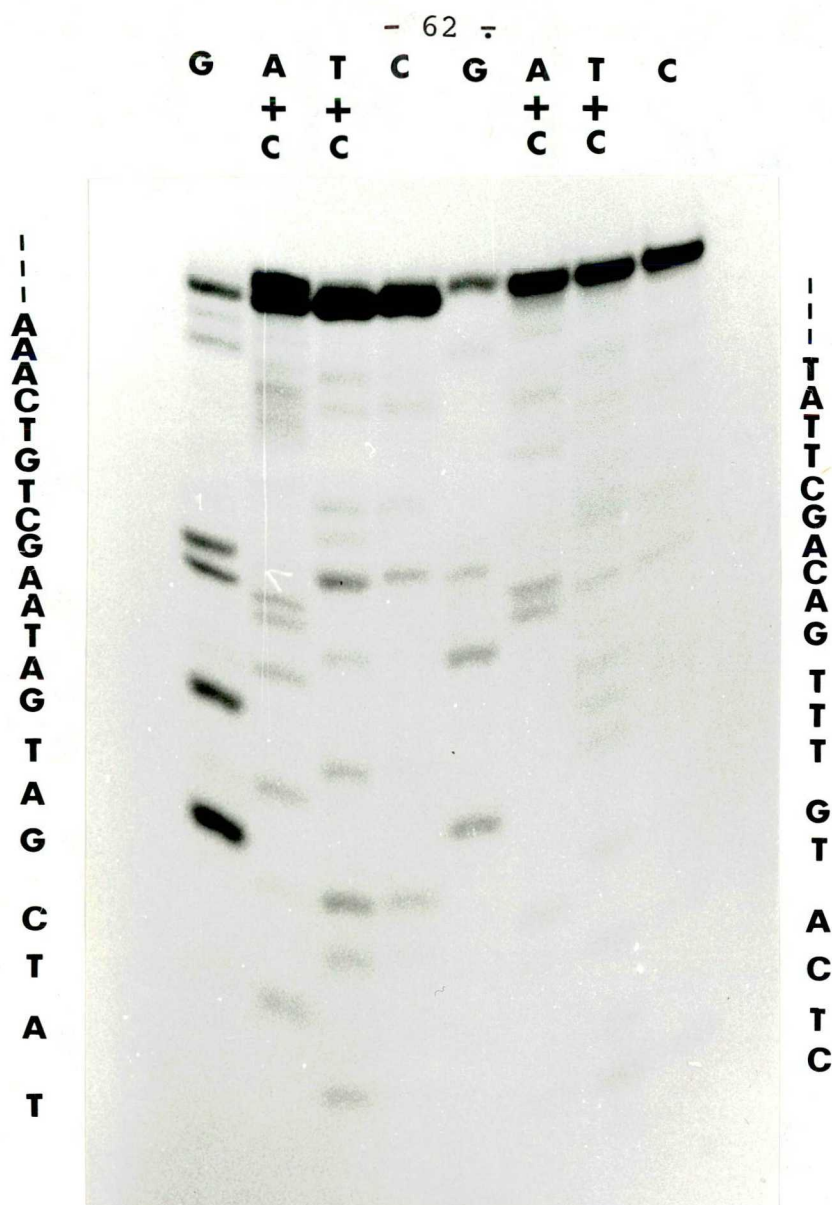
1. DNS szàl

2. DNS szàl

9. àbra

pBR313 plazmid DNS 32 P-jelölt HindIII-EcoRI fragmentumá-
nak izolálása szárelválasztással

pBR313 plazmid DNS HindIII fragmentumát 13-os preparatív agaróz gélelektroforézissel izoláltuk, majd EcoRI restrikciós enzimmel történő emésztés után a keletkezett fragmentumokat az 5'végek defoszforilálása után polinukleotid kinázzal jelöltük. A jelölt DNS fragmentumokat az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módon 12%-os poliakrilamid gélen szárelválasztásnak vezettük alá. A gélről készült autoradiogram alapján az elkülönült DNS szálakat /kis molsúlyú fragmentum esetében/ kivágtuk a gélből, és 1M-os NaCl-dal kinyertük a DNS-t.



10. ábra

Szálelválasztással izolált HindIII-EcoRI fragmentum
szekvenciájának meghatározása

A 12%-os poliakrilamid gélből izolált ^{32}P -jelölt DNS szálak szekvenciáját a Maxam-Gilbert technika Felhasználásával határoztuk meg az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módon. A jelölt hasítási termékeket ugyanazon a 20%-os poliakrilamid-8M karbamid gélen választottuk el.

/A 12%-os poliakrilamid gélből 1M NaCl-dal izolált DNS szálak aktivitása Cserenkov effektussal mérve 72000 ill. 36000 cpm volt./ A gélről készült röntgenfilmet 3 hétig exponáltuk.



Az autoradiogramok alapján a pBR313 plazmid DNS
HindIII-EcoRI fragmentumának a szekvenciája a következő:
EcoRI hasítási szekvencia

5'

A A T T C T C A T G T T T G A C A G C T T A T C A T C G A T A
- - - - -

G A G T A C A A A C T G T C G A A T A G T A G C T A T T C G A
- - - - -

AluI felismerő szekvencia

HindIII hasítási
hely

A gélről leolvasható szekvenciában felfedezhető az EcoRI és a HindIII restrikciós enzim felismerő szekvenciája, valamint egy AluI hasítási hely, megegyezően a Boyerék által közölt restrikciós hasítási térképpel (102).

Arra vonatkozólag, hogy a pBR313 plazmid DNS-ből izolált restrikciós fragmentum tartalmaz-e promotert, vagy sem, úgy tudunk választ adni, hogy részletesebben elemezzük a kapott szekvencia részletet.

Az eddig ismert promoter szakaszok néhány jellegzetes bázissorrendet tartalmaznak, amelyek kisebb eltérésekkel, valamennyi promoterben felismerhetők. Ilyen jellegzetes szekvenciák /amelyekből a kb. 40 bázispár hosszúságú promoter felépül/ a következők: 1/ felismerő szekvencia
2/ kötési szekvencia
3/ RNS iniciációs pont

Az eddig ismert promoterek szekvenciájának egy részletét a 4. táblázatban tüntettük fel.

4. táblázat

Az ismert promoter szekvenciák összefoglalása

RNS-polimeráz kötőhely		
DNS	GAAGTAACATGCAG	TAAGATA
T7 A3	GAAGTAAACACCG	TACGATG
fd G2	GCTTTGCTTCTGAC	TATAATA
fd G3	TGTTTCGCGCTTGG	TATAATC
λ p _r	TTACCTCTGGCGGT	GATAATG
λ p _l	ATACCACTGGCGGT	GATACTG
Lac /vad tipus/	ATGCTTCCGGCTCG	TATGTTG
Lac UV-5	ATGCTTCCGGCTCG	TATAATG
tRNS ^{Tyr} _I	GGCGCGTCATTTGA	TATGATG
Trp	ATCATCGAACTAGT	TAAC TAG
SV 40	TGTTTATTGCAGCT	TATAATG

Az általunk meghatározott DNS szekvencia tartalmazza a Trp promoter szekvenciájának egy 8 nukleotidból álló szakaszát, ATCATCGA-t /lásd bekeretezett részt a közölt szekvenciában/, és egy ugyancsak 8 nukleotidból álló szimmetrikus régiót /palindromot/ /lásd szaggatott vonallal aláhuzott szekvencia/, AGCTTATC. Az eddig ismert szekvencia adatok alapján a Trp promoterral analóg résztől 7 nukleotidra kezdődik a kötési szekvencia /Pribnow-box (111)/, amelynek kezdetétől számított 13. nukleotid felel meg az RNS iniciációs pontnak. /A kötési és a felismerő szekvenciák között mintegy 20-25 bázispár távolság van./

A pBR313 plazmid DNS hindIII-EcoRI fragmentum szekvenciáját vizsgálva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az irodalmi adatokkal megegyezésben, a fragmentum tartalmaz egy promotert, ill. annak egy részletét, és a HindIII restrikciós enzim valószínűleg ott hasítja a DNS-t, ahol az RNS-polimeráz kötési szekvencia kezdődik.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertáció témája a T4 bakteriofág által indukált polinukleotid kináz néhány, a DNS szerkezet kutatásban történő, felhasználási területének bemutatása. A munka eredményei az alábbi pontokban foglalhatók össze:

- 1./ T4amN82 fágfertőzött *Escherichia coli* B baktérium sejtekből tisztítottuk a fágindukált polinukleotid kinázt. Mintegy 1000-szeres tisztulást értünk el, és az enzimpreparátum nem tartalmaz szennyező nukleázokat, DNS ligázt, stb.
- 2./ Beállítottuk γ -helyzetben ^{32}P -jelzett nukleozid trifoszfátok laboratóriumi szintézisének módszerét. A nyert γ - ^{32}P /ATP preparátum tisztasága RNS-transzkripciós vizsgálatokra is megfelelőnek bizonyult. Módosítottunk egy enzimátikus γ - ^{32}P /ATP preparálást úgy, hogy a kereskedelmi legbeszerázhető ^{32}P felhasználásával megfelelő specifikus aktivitású jelzett ATP-t állíthassunk elő, ami módot nyújt nagy specifikus aktivitású DNS fragmentumok előállítására is /ez utóbbiak specifikus DNS szakaszok vizsgálatához nélkülözhetetlenek/.
- 3./ A polinukleotid kinázzal és γ - ^{32}P /ATP-vel végzett in vitro foszforilálási technika felhasználásával megteremtettük a lehetőséget bármely DNS vagy RNS molekula /vagy fragmentum/ szelektív radioaktív jelölésére, DNS vagy RNS molekulák homogenitásának vizsgálatára.

- 4./ Ezen technika felhasználásával meghatároztuk a csoportunkban *Bacillus sphaericus*-ből izolált új restrikciós endonukleáz, BspR hasítási szekvenciáját végcsoportjelöléssel.
- 5./ Megállapítottuk BspR emésztéssel DNS molekulákon előidézett hasítások számát / λ -DNS Bsp fragmentumainak számát/.
- 6./ pBR313 plazmid DNS HindIII-EcoRI fragmentumának a szekvenciáját meghatároztuk egy új DNS szekvenciázási módszernek, a Maxam-Gilbert technikának az alkalmazásával.

VI. IRODALOMJEGYZÉK

1. C.C.Richardson, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 54,158 /1965/
2. P.T.Englund, J.Mol.Biol. 66, 209 /1972/
3. J.E.Donelson, R.Wu, J.Biol.Chem. 247, 4661 /1972/
4. R.Wu, E.Taylor, J.Mol.Biol. 57, 491 /1971/
5. R.Wu, J.Mol.Biol. 51, 501 /1970/
6. R.Roychoudhury, E.Jay, R.Wu, Nucl.Acids. Res. 3, 863 /1976/
7. A Kiss, B.Sain, É.Csordás-Tóth, P.Venetianer, Gene, 1,
323 /1977/
8. J.H.van de Sande, M.Bilsker, Biochemistry 12, 5056 /1973/
9. A.Novogrodsky, J.Hurwitz, Federation Proc. 24, 602 /1965/
10. A.Novogrodsky, J.Hurwitz, J.Biol.Chem. 241, 2923 /1966/
11. A.Novogrodsky, M.Tal, A.Traub, J.Hurwitz, J.Biol.Chem. 241,
2933 /1966/
12. M.Ichimura, K.Tsukada, J.Biochem. /Tokyo/ 69, 823 /1971/
13. H.Teraoka, K.Mizuta, F.Sato, M.Shimoyachi, K.Tsukada, Eur.J.
Biochem. 58, 297 /1975_
14. C.Levin, S.B .Zimmerman, J.Biol.Chem. 251, 1767 /1976/
15. G.E.Austin, D.Sirakoff, B.Roop, G.H.Moyer, BBA 522, 412 /1978/
16. D.G.Evans, A.V.Muir, B.A.Milman, H.M.Keir, Biochem.Soc.Trans.
3, 1129 /1975/
17. G.C.F.Pedrali Noy, L.Dalpra, A.M.Pedrini, G.Ciarrocchi,
E.Giulotto, F.Nuzzo, A.Falaschi, Nucl.Acids Res. 1, 1183 /1974/
18. A Panet, J.H. van de Sande, P.C.Loewen H.G. Khorana, A.J.
Raae, J.R.Lillehaug, K.Kleppe, Biochemistry 12, 5045 /1973/
19. J.R.Lillehaug, Eur. J.Biochem. 73, 499 /1977/
20. J.R.Lillehaug, K.Kleppe, Biochemistry 14, 1225 /1975/
21. J.H.van de Sande, K.Kleppe, H.G.Khorana, Biochemistry 12,
5050 /1973/
22. M.P.Deutscher, A.Kornberg, J.Biol.Chem. 244, 3019 /1969/
23. J.J.Furth, J.Hurwitz, M.Anders, J.Biol.Chem., 237, 264 /1962/
24. P.Modrich, G.R.Lehmann, J.C.Wang, J.Biol.Chem., 247,6370
/1972/
25. H.Sano, Biochim.et Biophys.Acta 422, 109 /1976/
26. W.D.Kroeker, M.Laskowski, Anal.Biochem 79, 63 /1977/

27. J.R.Lillehaug, K.Kleppe, Biochemistry 14, 1221 /1975/
28. J.R.Lillehaug, R.K.Kleppe, Biochemistry 15, 1858 /1976/
29. B.Weiss, T.R.Live, C.C.Richardson, J.Biol.Chem 243,
4530 /1968/
30. C.C.Richardson, J.Mol.Biol. 15, 49 /1976/
31. B.Weiss, C.C.Richardson, J.Mol.Biol. 23, 405 /1967/
32. R.Wu, A.D.Kaiser, J.Mol.Biol. 35, 523 /1968/
33. A.Jacquemin-Sablon, C.C.Richardson, J.Mol.Biol. 47, 477
/1970/
34. R.Knipppers, A.Razin, R.Davis, R.L.Sinsheimer, J.Mol.Biol.
45, 237 /1969/
35. M.Takanami, J.Mol.Biol. 29, 323 /1967/
36. M.E.Reichmann, A.Y.Chang, L.Faiman, J.M. Clark, Cold Spring
Harbor Symp.Quant, Biol. 31, 139 /1966/
37. I.E.Scheffler, E.L.Elson, R.L.Baldwin, J.Mol.Biol. 36,
291 /1968/
38. P.D.Sadowski, J.Hurwitz, J.Biol.Chem. 244, 6182 /1969/
39. P.D.Sadowski, J.Hurwitz, J.Biol.Chem. 244, 6192 /1969/
40. B.Weiss, C.C. Richardson, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 57,
1021 /1967/
41. A.Becker, J.Hurwitz, J.Biol.Chem. 242, 936 /1967/
42. R.P.Klett, A.Cerami, E.Reich, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 60,
943 /1968/
43. M.P.Deutscher, A.Kornberg, J.Biol.Chem. 244, 3029 /1969/
44. K.L.Agarwal, H.Büchi, M.H.Caruthers, N.Gupta, H.G.Khorana
K.Kleppe, A.Kumar, E.Ohtsuka, U.L.Raj Bhandary, J.H.vande
Sande, V.Sgaramella, H.Weber, T.Yamada, Nature 227, 27
/1970/
45. K.L.Agarwal, A.Yamazaki, P.J.Cashion, H.G.Khorana, Angewandte
Chemie 11, 451 /1972/
46. H.G.Khorana, K.L.Agarwal, H.Büchi, M.H.Caruthers, N.K.Gupta,
K.Kleppe, A.Kumar, E.Ohtsuka, U.L.Raj Bhandary, J.H.van de
Sande, V.Sgaramella, T.Terao, H.Weber, T.Yamada, J.Mol.Biol.
72, 209 /1972/
47. M.Silberklaug, A.M.Gillum, U.L.Raj Bhandary, Nucl.Acids Res.
4, 4091 /1977/
48. M.T.Doel, M.Houghton, E.A.Cook, N.H.Carey, Nucl.Acids.Res. 4,
3701 /1977/

49. A.Efsratiadis, J.N.Vournakis, H.D.-Keller, G.Chaconas, D.K. Dougall, F.C.Kafatos, Nucl.Acids Res. 4, 4165 /1977/
50. M.Székelly, F.Sanger, J.Mol.Biol. 43, 607 /1969/
51. F.Sanger, G.G. Brownlee, B.G.Barrell, J.Mol.Biol. 13, 373 /1965/
52. G.G.Brownlee, F.Sanger, J.Mol.Biol. 23, 337 /1967/
53. G.G.Brownlee, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 13, /North-Holland, Amsterdam, 1972/
54. H.O.Smith, M.L.Birnstiel, Nucl.Acids Res. 3, 2387 /1976/
55. W.Gilbert, A.Maxam, A.Mirzabekov, in Control of Ribosome Synthesis /edit. by N.O.Kjelgaard and O.Maaloel /The Alfred Benzon Symposium IX, Munksgaard, Copenhagen, Denmark/ 139 /1976/
56. A.M.Maxam, W.Gilbert, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 560 /1977/
57. A.Simoncsits, G.G.Brownlee, R.S.Brown, J.R.Rubin, H.Guilley, Nature, 269, 833 /1977/
58. F.Sanger, A.R.Coulson, J.Mol.Biol. 94, 441 /1975/
59. G.B.Kolata, Science 192, 645 /1976/
60. F.Sanger, G.M.Air, B.G.Barrell, N.L.Brown, A.R.Coulson, J.C.Fiddes, C.A.Hutchison, P.M.Slocombe, M.Smith, Nature 265, 687 /1977/
61. W.Fiers, R.Contreras, G.Haegeman, A.Van de Woorde, H.Van de Heuverswyn, G.Volckaertanol, M.Ysebaer, Nature 273, 113 /1978/
62. M.Meselson, R.Yuan, Nature 217, 110 /1968/
63. S.Linn, W.Arber, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 59, 1300 /1968/
64. H.O.Smith, K.W.Wilcox, J.Mol.Biol. 51, 379 /1970/
65. T.J.Kelly, H.O.Smith, J.Mol.Biol. 51, 393 /1970/
66. H.W. Boyer, Ann.Rev, Microbiol. 25, 153 /1971/
67. M.Meselson, R.Yuan, J.Heywood, Ann.Rev.Biochem. 41, 447 /1972/
68. D.Nathans, H.O.Smith, Ann.Rev.Biochem. 44, 273 /1975/
69. R.J.Roberts, CRC Critical Reviews in Biochemistry, 123, /1976/
70. G.S.Hayward, Virology 49, 342 /1972/

71. T.Maniatis, A.Jeffrey, H.van de Sande, Biochemistry 14, 3787 /1975/
72. P.D.Lawley, P.Brookes, Biochem. J. 89, 127 /1963/
73. E.Krick, P.Emmelot, Biochim.Biophys. Acta 91, 59 /1964/
74. A.Temperli, H.Turler, P.Rust, A.Danon, E.Chargaff, Biochim. Biophys. Acta 91, 462 /1964/
75. D.H.Hayes, F.Hayes-Baron, J.Chem.Soc. 1528 /1967/
76. A.R.Cashmore, G.B .Petersen, Biochim. Biophys.Acta 174, 591 /1969/
77. A.D.Mirzabekov, A.F.Melnikova, Mol. Biol.Rep. 1, 385 /1974/
78. B.Singer, in Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology /ed. by W.Cohn/, Academic Press, New-York, 15, 215 /1975/
79. A.D.Mirzabekov, A.F.Melnikova, Molec.Biol.Rep. 1, 379 /1974/
80. W.Gilbert, A.Maxam, Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 70, 3581 /1973/
81. U.E.Loening, Biochem.J., 102, 251 /1967/
82. J.Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York /1972/
83. R.N.Yoshimori, Ph.D.Thesis, University of California at San Francisco, Medical Center /1971/
84. R.B.Helling, H.M.Goodman, H.W. Boyer, J.Virol. 14, 1235 /1974/
85. P.A.Sharp, B.Sugden, J.Sambrook, Biochemistry 12, 3055 /1973/
86. C.Aaij, P.Borst, Biochim.Biophys.Acta 269, 192 /1972/
87. J.Olmsted, D.R.Kearns, Biochemistry 16, 3647 /1977/
88. P.H.Johnson, L.I.Grossman, Biochemistry 16, 4218 /1977/
89. L.Cunningham, B.W.Catlin, M.J.Privat de Garilhe, J.Am.Chem. Soc. 78, 4642 /1956/
90. L.Cunningham, J.Am.Chem. Soc. 80, 2546 /1958/
91. M.J.Privat de Garilhe, L.Cunningham, U.R.Laurila, M. Laskowski, J.Biol.Chem. 224, 751 /1957/
92. M.Alexander, L.A.Heppel, J.Hurwitz, J.Biol.Chem. 236, 3014 /1961/
93. C.C.Richardson, A.Kornberg, J.Biol.Chem. 239, 242 /1964/
94. Y.Nishizuka, F.Lipmann, J.Lucas-Lenard, in S.P.Colowick and N.O.Kaplan /eds./, Methods in Enzymology, XII/B, Academic Press, New York, 708 /1968/

95. A.T.Jagendorf, M.Avron, J.Biol.Chem. 231, 277 /1958/
96. J.G.Moffatt, Can.J.Chem. 42, 599 /1964/
97. M.Cashel, R.A.Lazzarini, B.Kalbacher, J.Chromatog. 40,
103 /1969/
98. I.M.Glynn, J.B.Chapell, Biochem.J. 90, 147 /1964/
99. C.C.Richardson, C.L.Schildkraut, H.V.Aposhian, A.Kornberg,
J.Biol.Chem. 239, 222 /1964/
100. O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall, J.Biol.Chem.
193, 265 /1951/
101. R.Wu, A.D.Kaiser, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 57, 170 /1967/
102. F.Bolivar, R.L.Rodriguez, M.C.Betlach, H.W.Boyer, Gene 2,
75, /1977/
103. D.B.Clewell, J.Bacteriol. 110, 667 /1972/
104. D.B.Clewell, D.R.Helinski, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 62,
1159 /1969/
105. T.Tanaka, B.Weisblum, J.Bacteriol. 121, 354 /1975/
106. T.Tanaka, B.Weisblum, M.Schnos, R.B.Inman, Biochemistry 14,
2064 /1975/
107. J.H.Middleton, M.H.Edgell, C.A.Hutchison III, J.Virol. 10,
42 /1972/
108. S.Bron, K.Murray, Mol.Gen.Genet. 143, 25 /1975/
109. A.Kiss, B.Sain, I.Kiss, I.Boro ss, A.Udvardy, P.Venetianer,
Gene /submitted/
110. R.L.Rodriguez, R.Tait, J.Shine, F.Bolivar, H.L.Heyneker, M.
Betlach, H.W.Boyer, Ninth Miami Winter Symposia, 13, /1977/
111. D.Pribnow, J.Mol.Biol. 99, 419 /1975/