

RHIZOBIUM-FÁG- ÉS PLAZMID DNS-EK

Mink Mátyás okl. vegyész

Doktori értekezés

MTA SzBK Genetikai Intézet

Szeged, 1979.



Tartalomjegyzék

	oldal
BEVEZETÉS	1
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
EREDMÉNYEK	30
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	52
ÖSSZEFOGLALÁS	57
IRODALOM	58



1. BEVEZETÉS

A 70-es években intenzív kutatómunka indult meg a nitrogénkötés tanulmányozására, közismert okok következtében: 1975-ös becslések alapján a nagymértékben növekvő műtrágya előállítás is csak mindössze 15 %-át / 3×10^7 tonna / fedezte az élővilág által egy év alatt felhasznált nitrogénnek. Más forrásokból is keletkeznek olyan nitrogén vegyületek, elsősorban oxidok, melyek szintén bekapcsolódhatnak a nitrogén ciklusba. Az ilyen eredetű nitrogén vegyületek is csak mintegy 10 %-át fedezik mindössze az élővilág által egy év alatt felhasznált nitrogénnek.

A fennmaradó 70 %-nyi évi hasznosítás, mintegy $1,5 \times 10^8$ tonna nitrogén a biológiai nitrogénkötés szabadon élő, vagy szimbiózisos formájában válik hozzáférhetővé.

Laboratóriumunkban a szimbiózisos nitrogénkötés genetikai és biokémiai tanulmányozása folyik. Az általunk vizsgált szimbiózisos rendszer egyik partnere egy, a *Rhizobium* genusba tartozó baktérium, a *Rhizobium meliloti* 41-es törzs a másik partner a pillangós növény, a lucerna / *Medicago sativa* /. A szimbiózisos nitrogénkötés fontossága következtében érthető az a világszerte egyre intenzívebbé váló kutatómunka, amely annak biokémiai és genetikai hátterét igyekszik meg-

fejteni, elsősorban az egyik partner, a baktérium oldaláról.

Különböző *Rhizobium* törzsekkel transzformációt, transzfekciót, transzdukciót és konjugációt valósítottak meg. Mindezek olyan információ-átviteli lehetőségek, melyek a genetikai analízis alapjait képezik.

1.1. Genetikai analízis *Rhizobium*okkal

Genetikai analízis elvégzéséhez egyrészt mutánsok sorozata, másrészt egy genetikai információ-átviteli rendszer szükséges. Az előbb felsorolt információ átviteli rendszerek segítségével a bakteriális kromoszóma részleges vagy teljes genetikai térképe megszerkeszthető. Az információ-átviteli rendszerek lehetőségeit illetve korlátait az alábbiakban ismeretjük.

1.1.1. Speciális transzdukció

Mérsékelt bakteriofággal való fertőzés után viszonylag nagy gyakorisággal találhatunk olyan baktériumsejteket, melyek a fág-DNS-t saját kromoszómájukba épülve hordozzák. Ezen úgynevezett lizogén sejtek külső indukció hatására /ultraibolya fény, mitomicin/ fág termelésére képesek. Bizonyos gyakorisággal meg-

történik, hogy "rossz" kivágódás következtében a fág DNS egyharmad-egynegyed része bakteriális eredetű DNS-sel cserélődik ki. A keletkezett lizátummal mutáns baktérium sejteket fertőzünk.

A fertőzést túlélő baktériumok között találhatunk olyan telepeket, melyek egy bizonyos genetikai jellegre rekombinánsok. A keletkezett rekombinánsokat transzdukánsoknak nevezzük; keletkezésük a fág részecskék által hordozott, és a sejtbe bejuttatott, prototróf tulajdonságot kódoló bakteriális DNS-nek a sejtbe való jelenlétével magyarázható. Speciális transzdukciót mutattak ki a 16-3 mérsékelt fággal *Rhizobium meliloti* 41-ben / 1. /.

A speciális transzdukció genetikai finom térképezésre alkalmas, mivel mindössze a fág att régiójának jobb és bal oldalán elhelyezkedő gének mobilizációjára képes, például a **1** fág esetén a gal operon és a bio operon.

1.1.2. A 16-3 fág genetikai és fizikai térképének áttekintése

A 16-3 fág genetikai szempontból igen jól ismert. Kidolgozottak a fág mutánsok izolálásának és a mutációk térképezésének módszerei / 2., 3. /. Hőérzékeny /ts/, hőindukáló /ti/, különböző tarfolt morfológiájú /Nz,C/,

host range /h/, elbérő antigén hatású /Ant⁻/, valamint deléciós mutánsok sorozata ismert / 2. /. Ezen mutációk helyének pontos meghatározására igen érzékeny, nagy felbontóképességű rendszer áll rendelkezésre. A mutációk helyének meghatározása, és az egyes mutációk közti rekombinációs gyakoriság elemzése alapján a 16-3 fág genetikai térképe nagy pontossággal ismert.

A fág gének szekvenciális elrendezettsége az alábbi:

Csendes régió - C gén - korai gének - késői gének - lizis gének / 3.,4. /.

Figyelemre méltó, hogy a fág genom legalább 35 %-a a genetikailag csendes, nem esszenciális régió / 4. /. Ilyen szempontból is hasonló a 16-3 fág a λ fághoz: ennél ugyanis a genomnak mindössze 40 %-a létfontosságú / 68. /.

A transzdukáló és tarfolt képző 16-3 fág esetében minden valószínűség szerint a csendes régió cserélődött ki bakteriális eredetű DNS-sel / 1. /.

Ugyancsak a csendes régió jelenléte indikálja annak a lehetőségét, hogy a 16-3 fág mint klónozó vektor jöhet számításba. Ezt a lehetőséget alátámasztja az a tény is, hogy a 16-3 fág fizikai térképe is elkészült. A Bgl II, a Hind III, a Hpa I, a Kpn I restriktációs enzimekkel teljes, az EcoR I enzimmel

részleges fizikai térkép ismert / 4. /.

Az in vivo technikával készült pGY2 plazmid a 16-3 fágot hordozza, és átvihető konjugációval *E. coli*-ba, onnan *Rhizobium*-ba / 5. /. Mindezek figyelembevételével, a fizikai és genetikai térkép összehasonlításával fennáll annak a lehetősége hogy a Kpn I, Bgl II, valamint a Hpa I enzimek által kihasított legnagyobb fragmens maga lehet klónozó vektor / 4. /.

1.1.3. Általános / generális / transzdukció

E transzdukciós jelenség hordozója szintén bakteriofág, azonban mechanizmusa teljesen eltérő a speciális transzdukciótól.

Fágfertőzés után az egyes fágreszecskek gazdas sejten belüli "összeszerelése" folyamán az érett fág fejekbe az eredeti genomhoz hasonló méretű, de bakteriális eredetű DNS csomagolódhat be. Ennek következtében a baktérium kromoszóma bármely helyéről származó DNS darab ily módon becsomagolódhat, ha mérete nem sokkal különbözik az eredeti fág DNS-től. Az így nyert lizátummal való fertőzés után mutáns baktériumokban transzdukánsokat izolálhatunk.

A fág genom körülbelül egy százalékát teszi ki a teljes bakteriális kromoszómának. Emiatt az általa-

nos transzdukció elsősorban finomtérképezésre alkalmas, és közeli gének közötti kapcsoltság kalkulálható segítségével. Rhizobium meliloti 15-30-ban Kowalski / 6.,7. /, Rhizobium meliloti 41-ben Sik és munkatársai / 8. /, Rhizobium leguminosarumban V. Buchanan-Wollaston / 9. /, Rhizobium meliloti GR4-ben Casadesus és Olivares / 10. / mutatott ki általános transzdukciót.

Megjegyezzük még, hogy in vitro körülmények között is lehetőség nyílik általánosan transzdukáló fág részecskék képzésére. A P22 Salmonella fág esetén igazolták ezt / 11. /, amikor " DNS donor extraktum" jelenlétében P22 feji fehérjék és ATP hozzáadásával általánosan transzdukáló - bakteriális DNS-t tartalmazó - fág részecskéket kaptak / 12. /.

A "DNS donor extraktum"-ot olyan indukált lizogénből nyerték, amelyben a beépült profág feji fehérje génjében mutáns volt, tehát ép fág összeszerelése csak akkor történt meg, ha kívülről adott feji fehérjék és ATP jelen voltak a rendszerben.

1.1.4. Bakteriális konjugáció

F faktorral rendelkező F^+ baktériumtörzsek képesek arra, hogy az ivaros megtermékenyítéshez némi-

képp hasonlóan recipiens F^- törzsbe saját genetikai anyag egy részét vagy egészét átjuttassák.

A donor sejtben az ugynevezett "rolling circle" mechanizmussal szintetizálódott egyes szálú DNS jut az előzőleg létesített protein hidon át a recipiens sejtbe, ahol a komplementer szál szintetizálódik. A recipiens sejtben a homológ kromoszóma részek között rekombináció mehet végbe. A folyamat során parciális zigóta / merozigóta / képződik. Az F^+ tulajdonságért felelős genetikai anyag egy cirkuláris DNS molekula / plazmid /, mely az F^- sejtbe jutva azt F^+ tulajdonságúvá alakítja.

Bár Rhizobiumok esetében is voltak utalások konjugációra / 69., 13. /, azonban 1977-ig noduláló és nitrogént kötő Rhizobium genetikai térképe nem volt ismeretes.

A Pl inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidok széles gazdaspecifitásúak, közülük az R6845 feltevő kromoszóma mobilizáló tulajdonságú.

P plazmiddal történő térképezési kísérletek sikeresnek bizonyultak, és 1977-ben egymástól függetlenül két Rhizobium meliloti genetikai térképét közöltek. / 15., 16. /.

Bizonyossá vált, hogy hasonlóan az E. colihoz, e Rhizobiumok is kör alakú genetikai térképpel rendelkez-



nek. A P plazmidok segítségével történő genetikai térképezés igen hatékonynak bizonyult, és pillanatnyilag a legjobb módszernek tűnik.

Azonban mindeddig nem jelent meg közlemény, amelyben a szimbiózisos tulajdonságokért, mint például a gazda specifitás, gumóképzés, vagy a nitrogén kötésért felelős gének lokalizálása megtörtént volna szimbiózisos rendszerben, bár a közeli jövőben ez várható.

1.2. Bakteriális plazmidok

Plazmidoknak nevezzük azokat az önálló genetikai elemeket, melyek stabilan öröklődnek extrakromoszómális állapotban. Bizonyos plazmidok reverzibilisen képesek beépülni a gazdasejt kromoszómájába, ezeket episzómáknak nevezzük / 17. /. Felosztásuk több szempontból lehetséges; néhányat ezek közül ismertetünk.

Az egyik ilyen a már említett konjugációra képes plazmidok, melyeket szex faktornak is nevezünk. Ebbe a csoportba tartozó plazmidok kromoszóma mobilizációra képesek, és a bakteriális keresztezés során a donor sejt DNS-e mellett saját maguk is átkerülhetnek a recipiensbe.

A másik csoportba azok a plazmidok tartoznak, me-

lyek konjugációt nem képesek létrehozni. Mindkét csoportba tartozó plazmidok hordozhatnak kolicin termelésért, antibiotikum rezisztenciáért, enterotoxin termelésért felelős géneket. Ennek megfelelően ezek elnevezése: Col, R vagy Ent plazmidok.

A plazmidok felcsavarodott / supercoiled /, kovalensen zárt kör /CCC/ alakú DNS molekulák. Ez a tulajdonságuk lehetővé teszi, hogy interkalálódó festék jelenlétében a tisztított bakteriális DNS preparátumból CsCl sűrűség grádiens centrifugálással a plazmid DNS-t elválasszuk az összetöredezett, lineáris DNS-től / 18. /.

Ugyanazon sejten nem minden plazmid képes együttesen fennmaradni. E tulajdonságuk alapján osztjuk fel a bakteriális plazmidokat különböző inkompatibilitási csoportokba. Mintegy 24 inkompatibilitási csoport ismeretes / 19. /. Általában ugyanazon inkompatibilitási csoportba tartozó, két különböző plazmid stabilan nem marad meg egy sejten belül, ugyanakkor más csoportba tartozóval igen.

A sejtenkénti kópiaszám alapján is különbséget tehetünk egyes plazmidok között. Például az RSF¹⁰⁰⁰ jelű E. coli plazmid 20-40 példányszámban található sejtenként, az ilyen típusú plazmidot relaxátnak nevezzük. Ez a szám még igen erősen növelhető, ha a

kultúrához protein szintézist gátló klóramfenikolt adunk. Ebben az esetben a példányszám 1000-2000-re is növekedhet sejtenként / 20. /.

A sejtenkénti néhány kópiaszámban jelenlévő plazmidokat stringensnek nevezzük; általában ezek klóramfenikollal nem amplifikálhatóak / 21. /.

1.3. Rhizobium plazmidok

A Rhizobiaceae család mindössze két nemzetségből áll: *Agrobacterium*- és *Rhizobium*ból. Mindkettő képes arra, hogy a gazda növényen sejt osztódást váltson ki. *A. tumefaciens* és *A. rubi* növényi tumort indukálnak, *A. rhizogenes* gyökér proliferációt okoz, míg különböző *Rhizobium* specieszek gumóképzést indukálnak pillangós növények gyökerein. *A. tumefaciens* tumort okozó képességét nagy plazmidok /TI-plazmid/ irányítják / 22., 23. /, melyek molekulásúlya 98×10^6 - 158×10^6 D tartományban terjed ki. Hasonlóképpen nagyméretű plazmid molekulát izoláltak *A. rhizogenes*ben és *A. rubi*ban / 22. /.

Feltűnő a hasonlóság, amikor négy kontinesről származó 25 Rh. meliloti törzset vizsgáltak meg nagy plazmid jelenléte szempontjából / 24. /. Azt az érdekes eredményt kapták, hogy 25, szimbiózisban hatékony

törzs közül 22-ben kimutatható volt nagy plazmid, melyek molekulásúlya 90×10^6 – 200×10^6 tartományban volt. Lehet hogy *Rhizobium meliloti* esetében a nitrogénkötés mechanizmusának egyes lépései plazmidon kódoltak.

Rhizobium leguminosarum esetében ezt részben igazolták is. Southern technikával / 25. / néhány *Rh. leguminosarum* nagy plazmid *EcoRI*-el emésztett fragmensei közül némelyik hibridizálható *K. pneumoniae* *nif* régióját tartalmazó plazmidokkal / 26. /.

1.4. Nitrogénkötéssel kapcsolatos génmanipulációk

Az *in vitro* rekombinációs kísérleteknek számos előfeltétele volt. Az egyik – talán legfontosabb – a DNS-t egy bizonyos specifikus helyen felismerő, és ott, vagy annak közvetlen közelében elvágó fehérjék, a restrikciós endonukleázok felfedezése / 27., 28., 29., 30. /. P. Berg munkatársainak úttörő kísérlete / 31. /, majd H. Boyernek az *EcoRI* restrikciós endonukleáz által elvágott kettős szálú DNS végei komplementer voltának bizonyítása / 32. / teljesen új utat nyitott a molekuláris biológiában: a genetic engineering-et.

Elvileg lehetőség nyílt bármilyen forrásból származó DNS funkcionális tanulmányozására.

Gyakorlatban is már számos szép eredmény született, például az inzulin termelésért felelős gén klónozása.

E módszer jövőbeni lehetőségei szinte beláthatatlannak.

Néhány éven belül ismertekké váltak azok az eredmények, melyek a *Klebsiella pneumoniae* nif génjeit tartalmazó plazmidok, az FN68 és az RD1 megalkotását jelentették / 33., 34. /. Mindkét plazmid a *K. pneumoniae* his és nif génjeit hordozza; az RD1 plazmid a P típusú RP4 és az FN68 rekombinációja során keletkezett. Mindkettő ígéretesnek tűnt, azonban nagy méretük és alacsony példányszámuk sejtenként nem tette lehetővé nagy mennyiségben való preparálásukat; in vitro módszerekkel kisebb, jobban amplifikálható plazmidot, a pCRA 37-et állították elő / 35. /.

Nemrégiben vált ismertté, / 36. / két újabb plazmid, a pCMI és a pSA30 klónozása, melyek segítségével - beleértve a pCRA37-et is - a teljes nif régió átfedhető a nifJ gén kivételével. E három plazmid lehetővé teszi a szimbiotikus rendszerek nif géneinek azonosítását hibridizációs technikával.

Az eddigi munkák során a sok időt igénylő növényi teszt helyett a nif gének lokalizációja megállapítható /plazmid vagy kromoszóma/, és további, bioké-



miai módszerekkel való tisztításukat, klónozásukat teszi lehetővé.

1.5. Célkitűzés

A *Rhizobium meliloti* 4l 16-3 fágja speciálisan, a 1l fág általánosan transzdukál. Ugyanakkor ismert volt, hogy e két fág szerológiailag azonos: kölcsönösen inaktiválhatók mindkét fajta szérummal / 37. /. Ennek a jelenségnek a kontrollja is ismeretes: a 32 virulens Rh.m. 4l fág teljesen érzéketlen a másik két fág által indukált szérummal szemben, ugyanakkor a transzdukáló fágok sem inaktiválhatók a 32 fagra specifikus szérummal.

A transzdukciós viselkedésben mutatott különbség azonban mindenképpen indokoltá tette e két fág genom összehasonlító analizisét, mivel ez az eltérő tulajdonság egy genetikai változás következménye. Feltételeztük azt, hogy a rendelkezésre álló eszközökkel ezt a különbséget detektálni tudjuk. Kísérleteinkben a 16-3 fág mint viszonyító szerepelt, és nagy segítséget adott munkánkhoz az a tény, hogy genetikai és fizikai térképe ismert volt.

A dolgozat első részében a két fág DNS összehasonlító analizise során kapott eredményeket mutatjuk be.

A Rh.m.41 - hasonlóan más noduláló és nitrogén-kötő organizmusokhoz - plazmid DNS-el rendelkezik. E plazmid tisztításának, előállítási körülményeinek leírása nem egységes, nagy mérete következtében tisztítása körülményes.

A második rész a tisztítási körülmények beállítását, és a plazmid, a pRM41 részleges jellemzését tartalmazza.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Baktérium- és fág törzsek, táptalajok

A. Baktériumtörzsek

Rhizobium meliloti 41 / a továbbiakban Rm 41 / : lucernával szimbiózisban élő baktériumtörzset Szende és Ördögh izolálta talajból 1961-ben. Kísérleteinkben a vadtypusú származékot használtuk fel.

Rm 41 /16-3/: Rm 41-nek a 16-3 bakteriofággal lizogenizált származéka.

E. coli C600: λ fág titráláshoz használtuk.

E. coli / λ CI857/: λ CI857 fággal lizogenizált, hőindukáló *E. coli* törzs.

B. Fágtörzsek

16-3 fág: mérsékelt Rm 41 fág;

11 fág: Rm 41 fág; Szekeres izolálta 1975-ben, talajból.

A5 fág: Orosz izolálta; ez a 16-3 fágnak deléciós mutánsa; a deléciónagysága $7,1 \times 10^3$ bázispár / 4. /.

λ CI857: hőindukálható λ fág.

Kísérleteinkben komplett YTA táptalajt használtunk.

Ennek összetétele egy liter tápoldatban a következő:

Élesztő kivonat	1 g
Tripkazin	10 g
NaCl	5 g
KNO ₃	1,5 g
1 M MgSO ₄ oldat	1 ml
1 M CaCl ₂ oldat	0,5 ml

Lágy /fedő/ agar

A táptalajhoz 0,6 % agart adtunk

Szilárd táptalaj

Az YTA folyadékot 1,5 % agarral egészítettük ki.

2.2. DNS tisztítás fágból

Fág DNS tisztítását Sik / 38. / szerint végeztük el. Jó DNS preparátum készíthető abban az esetben, ha az előzetesen tisztított fág titere eléri az 5×10^{11} - 10^{12} fág/ml értéket. A fágok előzetes szaporítását és tisztítását többféleképpen oldottuk meg.

A. A 11-es fág szaporítása

Exponenciális fázisban lévő Rm 41 sejtek folyadék tenyészetét 1-es multiplicitással fertőztük. A fertőzéstől számított három óra múlva / ez két lizis ideje/ a tenyészethez néhány csepp kloroformot, valamint diatomaföldet adtunk, majd 4 °C-on éjszakán át állni hagytuk. Ezután G3 jelű zsugorított üvegszűrőn

szűrtük, majd 12000 percenkénti fordulatszámmal 90 perc alatt lecentrifugáltuk a tenyészetet. A felülúszót kiöntöttük, és ezután az üledéket éjszakán át szuszpendáltattuk 10^{-3} M MgCl-t, 5×10^{-4} M CaCl₂-t tartalmazó fiziológiás sóoldatban. / Rázás vagy erőteljes keverés hatására a fágok könnyen inaktiválódhatnak /. Ezzel a lépéssel mintegy százszoros töményítést érhetünk el, és a fág titere eléri a kívánt értéket. Abban az esetben, ha ez nem így volt, további centrifugálással és kisebb, 0,1-0,2-szeres térfogatban való szuszpendálással töményítettük a fágot.

B. A 16-3 fág szaporítása

Exponenciális fázisú Rm 41 /16-3/ lizogén sejtek folyadék kultúrájához 1,5 ug/ml végkoncentrációban mitomicint adtunk; ez a koncentráció elegendő a lizogén sejtek indukciójához. Lizis után a tenyészet feldolgozása megegyezik a 11-es fág esetén leírtakkal.

Más módszert jelentett a jólismert kettős agar technikával / 39. / szaporított fág szuszpenzió előállítása, amit a 16-3 fág esetén szintén kipróbáltunk. Mintegy 5000 pfu/lemez esetében egy lemezzről

mintegy 10^{11} fág nyerhető. A fedő agar eltávolítása és szürése után a feldolgozás menete ugyanaz, mint az előbbieken.

C. Az A5 fág szaporítása

Kis Burst értéke következtében szintén lemezen történt.

D. Az λ CI857 fág szaporítása

Exponenciális fázisú lizogén sejteket 42°C -on 20 percig hővel indukáltunk. A hőindukciós lépés után a sejteket 37°C -on 3 órán át tovább rázattuk, míg a lizist kloroform hozzáadásával értük el. A tenyészet szürése és további feldolgozása megegyezik a fentiekkel.

Az így előállított tömény fáguszuszpenzió titerét kettős agar technikával állapítottuk meg / 39. /. Abban az esetben, ha nagymértékben tisztított fágra volt szükségünk, akkor tovább CsCl lépcsős gradienszt használtunk, melynek lépcsői 1,3, 1,6, 1,75 g/cm értékek voltak a 11 és a 16-3 fágok esetében, mivel ezek úszó sűrűsége 1,55-1,56 g/cm / 8. /. Az A5 deléciós mutáns esetében a második lépcső sűrűsége: 1,45 g/cm volt.

A fág szuszpenziót a CsCl lépcsők fölé helyez-

tük el óvatosan, majd 90 percig 35000 percenkénti fordulatszámmal centrifugáltuk. A felső, vizes réteg leszivatása után a mintákat felülről frakcionáltuk, fágtartalmukat cseppentési teszttel határoztuk meg.

A tömény fág szuszpenziót frissen desztillált fenollal kezeltük; a fenolt előzetesen telítettük. A vizes fázis leszivatása után még egyszer fenoloztuk a mintát, majd steril dializáló hártyában 0,1 SSC oldattal szemben dializáltuk, állandó kevertetés mellett. A dialízis hatékonyságát többszörös puffercserével fokoztuk, és a pufferben 270 nm-en mért /fenol/ extinkciójának a csökkenésével követtük. A dialízist az itt mért extinkció 0-ra való csökkenésekor fejeztük be.

A DNS koncentrációját 260 nm-en mért extinkciójával határoztuk meg, tisztaságát az itt mért, valamint a 230 és 280 nm-en mért extinkciók hányadosával jellemeztük. Kielégítő tisztaságú az a DNS, melynek ezen értékei 1,8 körüli értéket adnak.

Az így tisztított DNS-t steril kémcsőben tároltuk 4 °C-on, használat közben steril pipettaheggyel vettük ki a preparátumból a kívánt mennyiségű DNS-t, amit ilyen körülmények között hónapokig tároltunk károsodás nélkül.

2.3. Plazmid DNS tisztítás Rm 41-ből

Már korábban is ismeretes volt, hogy különböző *Rhizobium* törzsek nagy plazmiddal rendelkeznek / 40. /, azonban egyértelmű módszer nem volt ismeretes a szakirodalomban, mely segítségével nagymértékben tisztított plazmid DNS előállítható *Rhizobium*ból. Ezért használtuk fel Currier és munkatársai / 41. / eljárását, amelynek módosítása kéziratként volt ismeretes. Ez a módszer sikerre vezetett, és ezt az alábbiakban ismertetjük.

1,5 l exponenciális fázisban levő Rm 41 kultúrát / $OD_{540}=0,4$ / centrifugáltuk, majd a sejteket 0,5 l TE pufferben szuszpendáltuk. A TE puffer összetétele: 0,02 M EDTA, 0,05 M Tris HCl, pH=8. A szuszpendált sejteket 30 ml 20 %-os SDS oldattal tartuk fel, és 60 ml 5 mg/ml koncentrációjú, 37 °C-on előemésztett promázt adtunk a lizátumhoz. A lizátumot 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. A tiszta, nagyon viszkózus lizátumot 5-10 másodpercig nyirtuk, majd 150/min fordulatszámmal mágneses keverővel kevertettük. Keverés közben 3N NaOH oldatot csepegtettünk a lizátumhoz, míg annak a pH-ja 12,1-12,3 közé beállt. További 3 perc keverés közben annyi szilárd NaCl-t oldottunk fel, míg annak végkoncentrációja 3 %-os nem lett.

Frissen desztillált, 3 %-os NaCl-al telített fenolt adtunk a lizátumhoz, azonos térfogatban, további tíz perc keverés mellett. A fenolos és vizes fázis szétválasztása után 1/100 térfogatnyi 1,5 M MgCl_2 , és 0,5 M Na_2HPO_4 oldatot adtunk a vizes fázishoz, valamint 0,7 térfogat 96 %-os etanolt.

A vizes fázis DNS tartalma -20°C -on éjszakán át kicsapódott, és kiülepedését a keletkezett MgHPO_4 csapadék segítette elő. Ezt az üledéket a lehető legkisebb térfogatú 0,1 M EDTA / pH=8 / oldatban szuszpendáltuk, majd TES pufferrel szemben kevertetés és többszöri puffercsere mellett steril dializáló hártyában dializáltuk. / A TES puffer összetétele: 0,05 M Tris HCl, 0,005 M EDTA, 0,05 M NaCl, pH=8,5 /.

Az így kapott tiszta DNS oldathoz annyi szilárd CsCl-t adtunk, míg annak törésmutatója, $n=1,390$ értéket elérte / $\rho = 1,5981 \text{ g/cm}^3$ /. Az oldathoz 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban etidiumbromidot adtunk, majd SW41-es rotorban 48 órán át 35000 percenkénti fordulatszámmal centrifugáltuk.

A centrifugális erőter által generált koncentráció /sűrűség/ grádiensben az oldat DNS tartalma az egyensúlyi helyzetnek megfelelő pozícióba vándorolt. A különböző sávokban elhelyezkedő DNS ultraibolya fényben láthatóvá válik. Grádiens centrifugálással

előállított plazmid DNS további feldolgozásra alkalmas volt. Tárolása a fág DNS-el megegyező módon történt.

2.4. Agaróz gélelektroforézis

A restrikciós enzimek felfedezése után vált szükségessé egy olyan analitikai módszer kifejlesztése, amely lehetővé teszi DNS fragmensek mólsúly szerinti elválasztását, és azok detektálását. Elektroforézissel már korábban is próbálkoztak DNS molekulasúly szerinti elválasztásával / 42. /, azonban a választott közeg / keményítő gél / tulajdonságai nem voltak kielégítőek.

Minden szempontból alkalmasnak tűnt az az elválasztás, melyben agaróz gélét használták / 43. /, sőt a gél koncentrációjától függő lineáris munkatartományt találtak. Kitűnt, hogy a módszer alkalmas viszonylag nagy pontossággal DNS mólsúly meghatározásra is / 44./.

Kísérleteinkben 1 %-os agaróz gélét használtunk, és a DNS sávok megjelenítésére etidiumbromidot használtunk, amit az elektroforetikus pufferben oldottunk fel. Ultraibolya fény alatt kedvező esetben mintegy 10 ng DNS szemmel látható és lefényképezhető egy sávban.



A kísérletek során csöves és függőleges lap / 45. / elrendezésben levő agaróz gél-t használtunk, az alkalmazott feszültség-grádiens 1-8 V/cm-es értékek között volt. Próbálkoztunk vízszintes lap gél-lel is / 46., 47. /, azonban ezek a kísérletek nem adtak olyan jó eredményt, mint a fentiek.

2.5. Restriktációs enzimek tisztítása

Kísérleteinkben használt restriktációs enzimek közül a BamHI-et, a PstI-et, és az EcoRI-et tisztítottuk. Tisztításukra számos általános módszer ismert / 48., 49., 50. /. A leírt módszerek nagymértékben hasonlóak, és az alábbi lépéseket tartalmazzák.

Az adott restriktációs enzimet termelő baktérium nagy mennyiségű / 10-20 liter / exponenciális fázisú folyadékkultúráját lecentrifugáltuk, és azonos térfogatban szuszpendáltuk. A sejteket ultrahangos dezintegrátorral tártuk fel, majd a sejttörmelékét 35000 percenkénti fordulatszámmal egy órán át centrifugáltuk. A felülúszó oldat elsősorban proteinek és összetöredezett nukleinsavakat tartalmaz. A következő lépésben ezek szétválasztása történik. Kétféleképpen végeztük el ezt a lépést: A BamHI és a PstI esetében Biogel A 05 töltetű oszlopon való kromatográfiával, az EcoRI esetében minden OD₂₆₀egységre adott

1 ml 10 %-os streptomycin szulfát oldattal történt. A Biogel oszlopról lejövő frakciók endonukleáz tartalmát teszteltük, az aktív frakciókat összeöntöttük és dialízis után DE 52-es ioncserélő-oszlopra vittük, Az EcoRI esetében a nukleinsavaktól megtisztított oldatot vittük fel DE 52-es töltetű oszlopra. Az oszlopról a megkötött fehérjéket sógrádienssel mostuk le.

Az aktív frakciók dialízise után P11 ioncserélő cellulóz-foszfát oszlopon tisztítottuk az anyagunkat. Az oszlopról ebben az esetben is sógrádienssel mostuk le a megkötött proteineket.

Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, és 50 % glicerint tartalmazó puffer oldattal szemben dializáltuk.

Az így kapott enzimek kielégítő tisztaságúnak bizonyultak, és -20°C -on tárolva aktivitásukból nem veszítettek, többszörös enzimfeleslegben éjszakán át a hozzáadott DNS-el nem kenődő, agaróz gélen éles fragmentumokat adtak.

2.6. DNS elektronmikroszkópia

Kleinschmidt kísérleteitől számítva / 51. / lehetővé vált DNS molekulák közvetlen megfigyelése elektronmikroszkópban. Az akkor használatos technika alap-

elvei azóta sem változtak. Elektronmikroszkópos preparátumkészítés az alábbi lépésekből áll.

Nagymértékben tisztított DNS-t olyan pufferben oldjuk, amely nagy koncentrációban tartalmaz sót / ammónium acetát /, vagy szerves oldószert / formamid /, valamint kis koncentrációban valamilyen amfipatikus tulajdonságú vegyületet: kis molekulasúlyú fehérjét, például citokrom c-t, lizozimet, vagy detergenst: benzil-alkil-ammónium-kloridot / BAC / / 52. /.

Ezt az oldatot terítjük szét az adott sóra vagy oldószerre nézve higabb puffer, a hipofázis felületén. A DNS-t tartalmazó oldat szétterül a hipofázis felszínén, és amfipatikus komponense monomolekuláris filmet képez.

Az oldatban levő DNS molekulák ehhez a réteghez abszorbeálódnak, Ehhez a réteghez érintjük hozzá egy előzetesen szénhártyával vagy parlodion filmmel borított rostélyt, és kiemeljük a hozzá tapadt DNS-t is. A rostélyt ezután nagy vákuumban 10^0 -os szög alatt nehézfém, például Pd vagy Pt elgőzölögtetésével árnyékoljuk, miközben a mintatartó asztalkát forgatjuk / "rotary" árnyékolás /.

Attól függően, hogy a szétterítés során milyen közeget használunk, vizes, illetve formamidos techni-

kát különböztetünk meg / 53. /, kísérleteinkben mindkét technikát használtuk. A szétterítő oldatban citokróm c volt az amfipatikus komponens. Nehezen értékelhető eredményeket kaptunk, amikor ehelyett BAC detergenst használtunk. A preparátumokat a Biofizikai Intézet Jeol elektronmikroszkópján tanulmányoztuk.

2.7. Elektronmikroszkópos heteroduplex analízis

Ha két rokon DNS molekula esetében a köztük fennálló inhomogenitásokra vagyunk kíváncsiak, illetve részleges szekvenciális hasonlóságot akarunk kimutatni két, különböző eredetű DNS között, akkor ennek közvetlen kimutatására alkalmas módszer az elektronmikroszkópos heteroduplex analízis / 54.,55.,56., 57.,58. /. Segítségével néhány száz bázispárra tehető különbségeket nagy biztonsággal ki lehet mutatni. A technika alapja az alábbi:

AA' és BB' komplementer szálakat tartalmazó rokon DNS molekulák ekvimoláris keverékének denaturálása után 50 %-os valószínűséggel keletkeznek az eredeti AA' és BB' homoduplex molekulák mellett AB' és BA' heteroduplex molekulák, ha denaturálás után renaturáló körülményeket biztosítunk.

A komplementer szálak szétválasztását 50 % formamidot tartalmazó oldat 90 másodpercig forró víz-fürdőn való melegítésével értük el. Ezután 0,2 M végkoncentrációban nátrium-perklorátot adtunk a reakcióelegyhez, és 37 °C-on egy órán át renaturáltattuk. Renaturálás után a mintát sótól és egyéb szennyeződésektől Sephadex G 100 oszlopon tisztítottuk / 59. /.

A szétterítéshez citokróm c-t adtunk, és 10 %-os formamidot tartalmazó hipofázisra vittük a mintát.

További feldolgozása megegyezik a 2.6. fejezetben leírtakkal; a jó feloldóképesség érdekében heteroduplex mintáinkat csak Pt-val árnyékoltuk.

2.8. Restriktációs enzimmel hasított DNS fragmens izolálása agaróz gélből

Számos módszer ismeretes a szakirodalomban, melyek segítségével preparatív módon DNS fragmens izolálható gélből / 59., 60., 61., 62. /. A leírt módszerek elvileg két csoportra oszthatók.

Az egyik módszer szerint az adott DNS fragmenst további elektroforézissel a gélből kivándoroltatjuk, azonban a gélből kilépett DNS-t valamilyen módon visszatartjuk. Ez megoldható például az adott fragmensnek dializáló hárttyába való futtatásával, vagy az elektroforézis körülményei között a DNS-t irreverzibi-

lisen megkötő adszorbens alkalmazásával / malachit zöld, hidroxí-apatit /. A gélből eltávolított DNS-t ezután a dializáló hártában töményithetjük, illetve az adszorbens felületéről eltávolíthatjuk.

A másik eljárás szerint az adott fragmenst tartalmazó agaróz gél darabot feloldjuk, és ezután tisztítjuk a DNS-t valamilyen módszerrel. Az agaróz oldását melegítéssel, agaráz enzim alkalmazásával, vagy 4 M-os KI oldatban való melegítéssel oldották meg.

Ez utóbbi módszert alkalmaztuk / 63. /, némi módosítással; lépéseit az alábbiakban részletezzük:

A kívánt fragmenst restrikciós enzimmel emésztés és gélen való futtatás után a gélből éles pengével kivágtuk. Feloldásához 4 M KI-ot, 20 mM TrisHCl-t, 7 mM 2 merkapto-etanol tartalmazó puffert / pH=8 / használtunk, az oldat 45 °C-on való enyhe rázogatósával.

Az agaróz oldódása után 25 percig SW 39-es rotorban 30000 percenkénti fordulatszámmal centrifugáltuk a mintát. A szol állapotú agaróz a centrifugacső aljára ülepedett, a DNS zöme a felülúszó oldatban maradt.

A felülúszót egy kis térfogatú / kb. 1 cm³ / hidroxí-apatit oszlopra vittük, egy oszloptérfogat KI-os pufferrel mostuk, majd három oszloptérfogatnyi

foszfát pufferrel / pH=6,7 / eluáltuk.

Az eluátumot 0,1 SSC oldattal dializáltuk, majd az eredeti térfogat 5 %-ára töményítettük polietilén-glikollal, ezután újra dializáltuk 0,1 SSC oldattal szemben.

Az egész eljárást a lehetőségekhez képest sterilen végeztük el, és az így előállított, viszonylag híg / mintegy 5 ug/ml koncentrációjú / DNS oldatot steril kémcsőben tartottuk.

A módszerrel-becslés alapján- mintegy 50-60 %-os kitermelést tudtunk elérni.



3. EREDMÉNYEK

3.1. A 11-es és a 16-3-as fág DNS-ek mólsúlyának meghatározása gélelektroforetikus módszerrel

A két fág DNS-t különböző restrikciós enzimekkel emésztettük, majd ezt követően a keletkezett DNS fragmenseket agaróz gélen választottuk szét.

Szembetünő, hogy a két fág DNS azonos restrikciós enzimmel emésztett futtatási képen semmi különbséget nem tudtunk kimutatni / 1. ábra /. A kísérleteket eredetileg ugyanis olyan céllal végeztük el, hogy a DNS-ek közötti feltételezett különbséget detektálni tudjuk, azonban ez ilyen módszerekkel nem érhető el.

Eredeti célkitűzésünket nem értük el, de ezek a kísérletek sok szempontból hasznosak voltak; segítségükkel viszonylag jó közelítéssel meghatároztuk a két fág DNS mólsúlyát. Az általunk kapott eredmények a kísérleti hibák határain belül megegyeztek a 16-3 fág esetében meghatározott értékkel / 64. /.

A gélelektroforézises mólsúlymeghatározás indirekt módszer, mivel egy adott restrikciós enzimmel hasított DNS fragmensek mólsúlya csak megfelelő kalibráció után számolható. Ezek összege tehát a genom méretével egyenlő.

A 2. ábrán két kalibrációs görbe látható; az itt szereplő pontok λ fág DNS-nek EcoRI enzimmel emésztett és gélen elválasztott fragmensei; ezek mérete viszonylag nagy pontossággal ismert / 44. /. Az abszcisszán önkényes egységekben felvett relativ elmozdulás, az ordinátán a fragmens mólsúlyok logaritmusai szerepel. Bizonyos tartományon belül linearitás áll fenn a két változó között; kisebb koncentrációjú gél használata jobb felbontóképességet és nagyobb lineáris tartományt jelent, mint ez az ábrán feltüntetett 0,7 %-os és 1 %-os agaróz gél adatainak összevetésével látható.

Az 1. ábra gélképéből számítható fragmens mólsúlyokat az 1. táblázat tartalmazza. A táblázat adataiból kitűnik a módszer fogyatékosága is, mivel az egyes fragmens mólsúly értékek mellett a szórásokat is feltüntettük. Látható, hogy az elhajló, nem lineáris tartományba eső fragmensek értékeinek számítása esetén az elkövetett hiba mintegy 10 %-os; ez tehát a 8-9 MD mólsúlyoknál nagyobb fragmensekre vonatkozik.

A mólsúly csökkenésével az elkövetett hiba is csökken, és egészen a körülbelül 2 MD értékig 4-5 %-os.

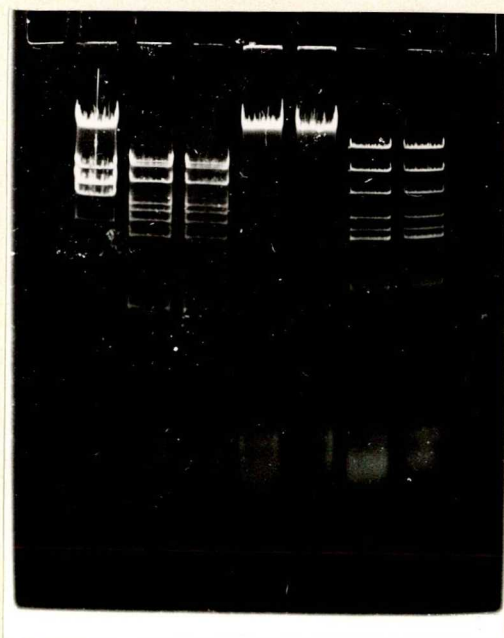
Az ennél kisebb mólsúlyú fragmensek esetében az elkövetett hiba újra növekszik, és a néhányszor 10^5 mólsúlytartományban 15-20 %-ot is elérheti. Mivel a geno-

mok zömét kitevő fragmensek mólsúlyainak értéke a 2-8 MD-os tartományba esik, az elkövetett hiba jelentősen nem nőtt meg.

A táblázat adataiból látható, hogy az egyes fragmensek gélen való eloszlásában, következés képp mólsúlyaiban, így ezek összegében azonos értéket kaptunk mind a két fág DNS-re a kísérleti hibahatáron belül. A 11-es fág mólsúlya és fragmentációs mintázata tehát azonos a 16-3 fágéval. Ez a tény is mutatja, hogy a két fág DNS, ennek következtében a két fág egymáshoz nagymértékben hasonló.

3.2. A két fág DNS mólsúlyának meghatározása elektronmikroszkóppal

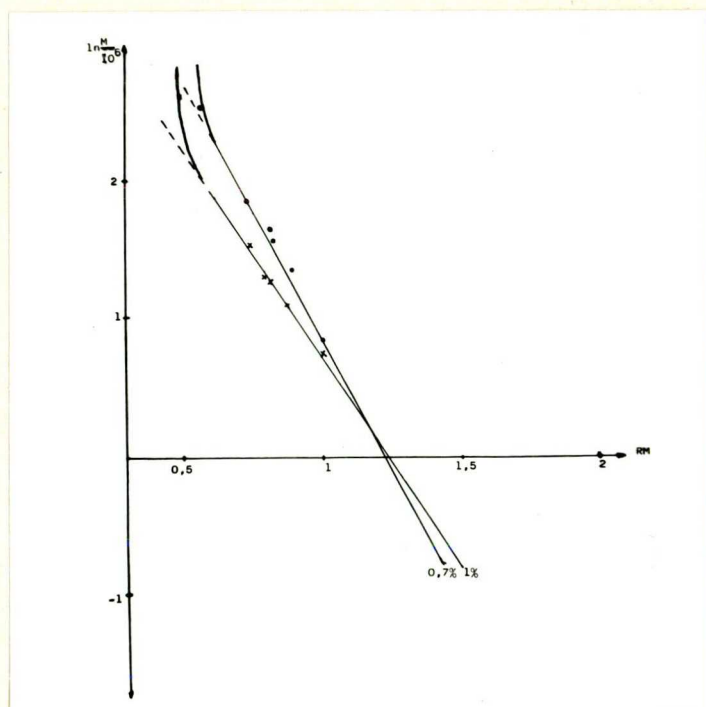
Gélelektroforetikus adataink ellenőrzése céljából a két fág DNS mólsúlyát elektronmikroszkóposan is meghatároztuk. Az ilyen mérések alapja a DNS kontúr hosszának meghatározása. Ez a szám, valamint a nagyítás értékével közvetlenül kalkulálható az adott DNS molekula abszolút hosszúsága. Megjegyezzük azonban, hogy egyértelműbbé akkor váltak volna eredményeink, ha belső standardként ismert, jól meghatározott DNS molekulát használunk; ilyen szempontból tehát az elektronmikroszkópos módszer is indirekt. Mivel belső



↑ 2 3 4 5 6 7

1. ábra. A keletkezett fragmensek gélelektroforetikus elválasztása.

1. λ /EcoRI; 2.,3. 11,16-3/EcoRI;
4.,5. 11,16-3/SalI; 6.,7. 11,16-3/PstI.



2. ábra. 0,7 és 1%-os agaróz gélek kalibrálása EcoRI enzimmel emésztett λ fággal



1. Táblázat

EcoRI, SalI és PstI enzimekkel emésztett fág DNS-ekből keletkező fragmensek mólsúlyainak kiszámítása.

Restriktációs enzimek

Fragmens N°

	EcoRI *	SalI	PstI +
1	5,31 ± 0,219	Egyik DNS-t	10,41 ± 0,983
2	5,25 ± 0,21	sem emészt	5,81 ± 0,27
3	4,97 ± 0,191		3,42 ± 0,21
4	4,11 ± 0,129		2,23 ± 0,20
5	4,0 ± 0,112		2,05 ± 0,19
6	2,97 ± 0,191		1,99 ± 0,16
7	2,68 ± 0,166		1,99 ± 0,16
8	2,36 ± 0,098		1,49 ± 0,11
9	1,91 ± 0,146		1,42 ± 0,091
10	0,81 ± 0,084		1,4 ± 0,090
11	0,72 ± 0,08		1,07 ± 0,092
12	0,58 ± 0,101		0,79 ± 0,097
13	0,53 ± 0,103		0,62 ± 0,112
14			0,59 ± 0,107
15			0,42 ± 0,110
16			0,31 ± 0,09
17			0,22 ± 0,093
Összeg:	36,2	-	36,23

* : 10 független mérésből számítva

+ : 3 független mérésből számítva

standard használata csak az eredmény pontosságát javítja néhány tized százalékos értékre, ezért megelégedtünk a kontúr hossz mérése során kapott eredményekkel. Ebben az esetben az elkövetett hiba 1-2 %-os, tehát sokkal jobb, mint a gélelektroforetikus módszer.

1 μm kontúrhosszúságnak kettős szálú DNS esetében irodalmi adatok alapján 2 MD mólsúlyérték felel meg / 53. /.

Mintáinkról $5-15 \times 10^3$ nagyítással készítettük felvételeinket. A 3. és a 4. ábra a 11-es és 16-3-as fág DNS-ek elektronmikroszkópos képét mutatják. A felvételen az 1 μm hosszúságot egy-egy berajzolt szakasz jelzi.

Mindkét DNS esetében a számított mólsúly 5-5 mérés eredményét figyelembe véve,

$$M = 37,4 \pm 0,73 \text{ MD}$$

értékűnek adódott, és ez az érték jó egyezést mutat az agaróz gélelektroforetikus mérésekkel, meghatározott mólsúlyokkal.

3.3. A 11-es fág DNS is ragadós végű

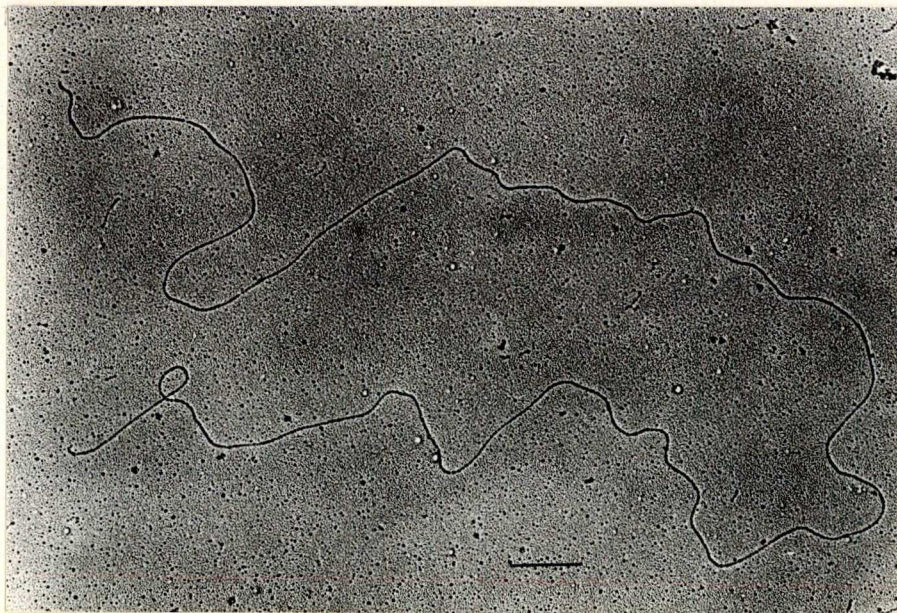
A 16-3 fág DNS ragadós végű: a DNS molekulák két végén komplementer, egyes szálú oligonukleotid rész van / 4. /. Ennek kimutatására az alábbi kísérlet al-

kalmazható: a fág DNS-t EcoRI enzimmel emésztjük, majd ezután az emésztett DNS egy részét 65 °C-ra melegítjük, jéggel hirtelen lehütjük, majd géltre visszük, akkor a gélen a nem melegített kontrollhoz viszonyítva két új fragmens keletkezik. Ez azt jelenti hogy, melegítéssel az addig H-híd kötéssel összetartott DNS fragmensek szétesnek, és a gélképen két új DNS fragmens látható.

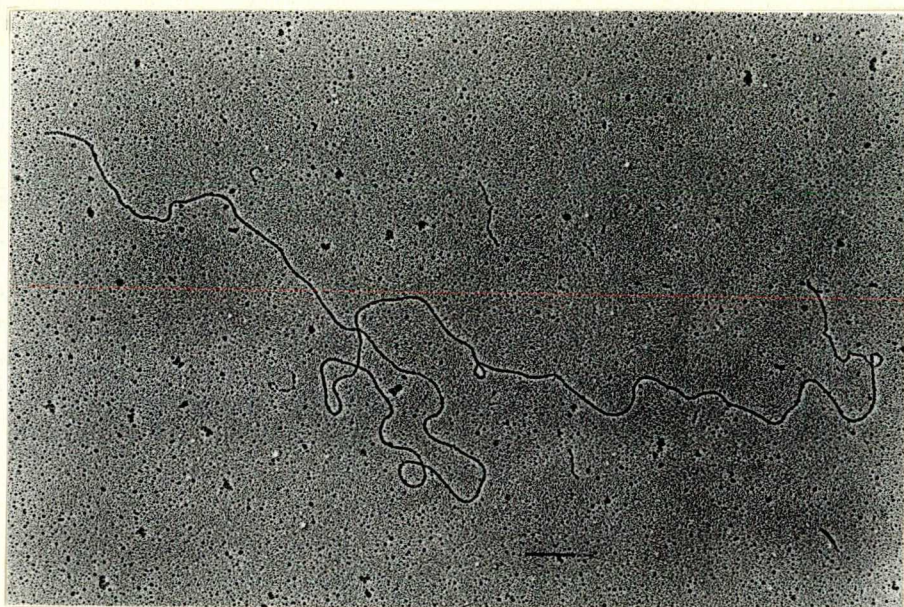
Ezt a kísérletet végeztük el a 11-es és a 16-3-as fág DNS-ekkel. Az 5. ábra mutatja ennek eredményét: a 11-es fág DNS esetében / 3. gél / a 16-3 fág DNS-hez hasonlóan két új fragmens jelenik meg; ez tehát azt jelenti, hogy a 11-es fág DNS is ragadós végű.

A helyzet tehát hasonló a λ fág esetén tapasztaltakkal: EcoRI enzimes emésztés után az első, legnagyobb és az ötödik, legkisebb fragmens kapcsolódik H-hiddal a ragadós vég következtében / 44. /.

A ragadós vég jelenlétének bizonyítására elektronmikroszkópos vizsgálattal is megpróbálkoztunk. Frissen elkészített, viszonylag tömény DNS preparátumból vizes technikával készült elektronmikroszkópos rostély tanulmányozása során viszonylag kis gyakorisággal találtunk cirkuláris formájú fág DNS molekulákat. A 6. ábra 16-3, a 7. ábra 11-es cirkuláris fág DNS-t mutat.

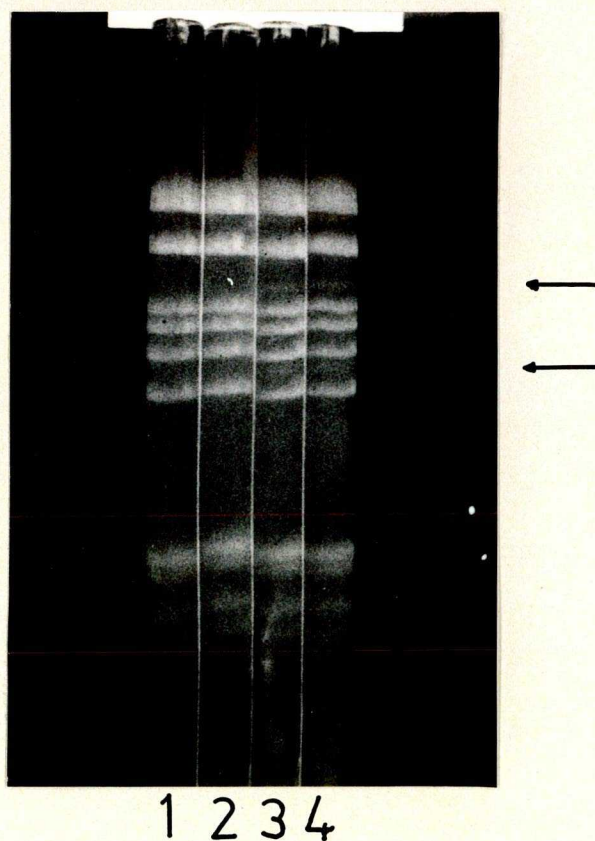


3. ábra. A 11-es fág DNS elektronmikroszkópos képe



4. ábra. A 16-3-as fág DNS elektronmikroszkópos képe





5. ábra. A ragadós végek megjelenítése agaróz gélen

- 1: EcoRI emésztett 11-es fág DNS
- 2: EcoRI emésztett 16-3-as fág DNS
- 3: EcoRI emésztett 11-es fág DNS, gélre
vitel előtt melegítve
- 4: EcoRI emésztett 16-3-as fág DNS, gélre
vitel előtt melegítve



6. ábra. Cirkuláris formájú 16-3 fág DNS



7. ábra. Cirkuláris formájú 11 fág DNS

A formamidos DNS elektronmikroszkópiás technika / 53. / használata ebben az esetben nem vezethet sikerre: a formamid jelenléte a H-hidas kötést denaturálja, alkalmazása során csak lineáris DNS molekulákat találunk / 3. és 4. ábra /. Ezek a vizsgálatok közvetlenül bizonyítják, hogy az agaróz gélelektroforetikus adatokból levont következtetések helyesek, és ezt direkt módon is sikerült igazolni: a 11-es fág DNS - hasonlóan a 16-3-hoz - szintén ragadós végű.

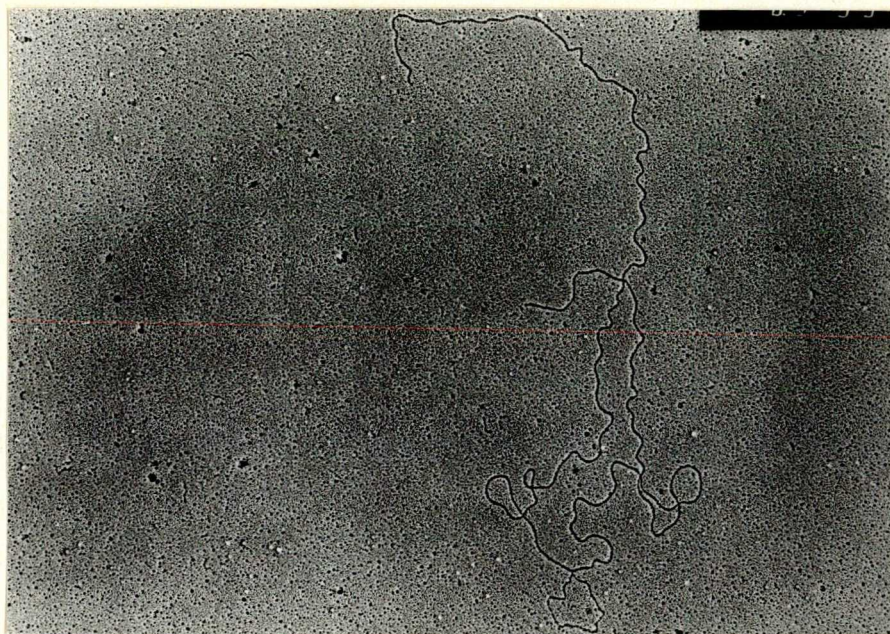
3.4. Heteroduplex analízis

Az előző fejezetekben láttuk, hogy e két fág: a 11 és a 16-3 DNS-e csak viszonylag kismértékben különbözhet egymástól, és az eddig felsorolt módszerek egyike sem alkalmas arra, hogy esetleg néhány száz bázispárra terjedő különbséget észlelni tudjuk. Olyan, nagyobb felbontóképességű módszert kellett keresnünk, amivel ez a határ elérhető. Egy ilyen módszer az elektronmikroszkópos heteroduplex analízis. Még mielőtt a 11 és a 16-3 fág DNS-ek között képződő heteroduplexet elkészítettük volna, egy jól ismert 16-3 deléciós mutáns, az A5 fág DNS-e és a 11 fág DNS-e között képződő heteroduplexet tanulmányoztuk.

Az A5 fágot Orosz László izolálta / 65. /; a de-

léción pontos helyét fizikai térképezéssel mutatták ki: a genom 40 és 50 %-a közötti DNS régió kiesett. Természetesen ez a darab esszenciális géneket nem tartalmaz, így a fággal az Rm41 gazda fertőzhető, a fág szaporítható. Genetikai kísérletekkel azt igazolták, hogy a kiesett DNS darab átfedi a C gént, mivel a homológ mutáns régiókkal rekombinációt nem sikerült kimutatni.

Ezt a kísérletet azért végeztük el, hogy a deleción kívül eső régiókban jelentkező, szekvenciális vagy más egyéb inhomogenitásokra visszavezethető különbségeket ki tudjuk mutatni.



8. ábra. A 11 és az A5 fág DNS-ek között keletkezett heteroduplex

A 8. ábra egy 11-es és egy A5-ös egyes szálú, komplementer DNS renaturációja után keletkezett heteroduplex molekulát mutat be. A felvételen az egyes és a kettős szálú DNS jól elkülöníthetően látszik, és a deléciós régió kívül inhomogenitásra utaló jel nem látható, legalábbis ezzel a módszerrel ki nem mutatható.

A deléció a genom 40,3 %-ánál kezdődik, és a 48,6 % értékig húzódik. Ezt az értéket 11 felvétel alapján határoztuk meg. Maga a heteroduplex egy 7,53 μm valamint egy 9,61 μm hosszúságú kettős szálú, és egy 1,6 μm hosszúságú egyes szálú DNS-ből áll.

A talált értékek a fizikai térképpel jó összhangban vannak, egymást jól kiegészítik. Ugyanakkor a deléción kívül eső részek teljesen homogének, komplementerek, azaz a 11 és a 16-3 fág DNS-ek szekvenciája a deléción kívül eső tartományban minden valószínűség szerint megegyezik.

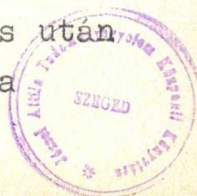
Mindezekből arra következtetünk, hogy a feltételezett különbség a 11 és a 16-3 fág DNS-ek között a delécióval érintett DNS darabra esik, és így további vizsgálatainkat leszűkíthetjük az egész genom helyett annak mintegy 10%-os darabjára, ha találunk alkalmas módszert ennek a DNS fragmensnek az elkülönítésére mindkét fágból.

Ennek érdekében az A5-ös fág DNS-t, valamint valamelyik transzdukáló fág DNS-ét restrikciós enzimekkel emésztetteük, annak eldöntése érdekében, hogy találunk-e olyat, mely az általunk kimutatható módon maradék nélkül kivágja az A5-ös delécióval analóg régiót.

A 9. ábrán a 11, 16-3 és A5 fág DNS-ek BamHI restrikciós enzimmel emésztett agaróz gélen futtatott gélképe látható. Az A5 fág DNS esetében felülről a 3. fragmens hiányzik ami azt jelenti, hogy a 3. BamHI fragmens tartalmazza az A5-ös delécióval érintett régiót.



9. ábra. 11, 16-3 és A5 fág DNS-ek BamHI emésztés után keletkezett fragmensei gélen elválasztva



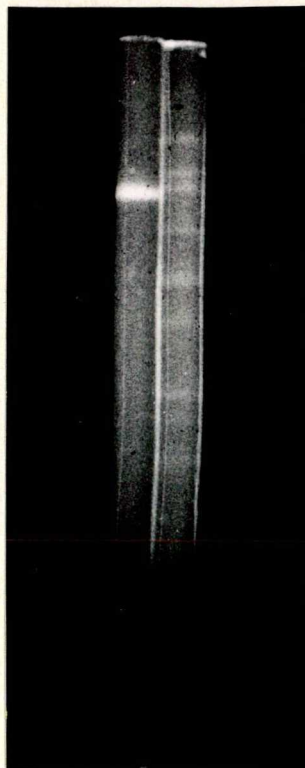
A 3. BamHI fragmens mólsúlya gélelektroforetikus adatok alapján $5,2 \pm 0,23$ MD. A deléciós hurok / egyes szálú DNS / hossza $1,6 \mu\text{m}$, amit elég óvatosan kell kezelni, mivel egyes szálú DNS kontúr hosszúság alapján mért molekulasúlya gyakran bizonytalan. Ezt alapul véve az A5 delécio $3,2$ MD nagyságú. Minden valószínűség szerint a reális érték a két adat között van, amint ezt Dallman és munkatársai / 4. / megállapították: $7,1$ Kb, azaz $4,4$ MD.

Nagy mennyiségű 11 és 16-3 fág DNS BamHI-vel való emésztése és gélen való futtatása után a 3. fragmenst éles pengével kivágtuk, és abból a DNS-t visszaizoláltuk.

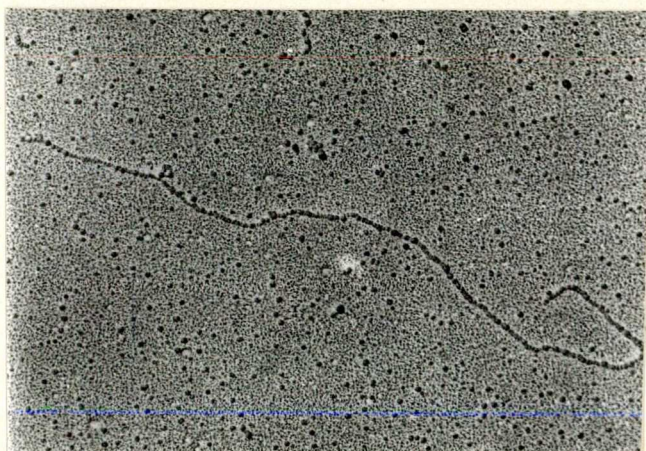
A 10. ábra mutatja a 16-3 fág DNS BamHI-el emésztett fragmenseit, amit egy időben futtattunk az izolált fragmenssel. Egyik BamHI fragmenssel sem összetéveszthető pozícióban, a 3. sáv helyzetében látható az izolált fragmens; jelezve azt, hogy homogén, és az izolálás jól sikerült.

3.4.1. Heteroduplex képzés a 3. BamHI fragmensek között

A 3. BamHI fragmens izolálása után mindkét fág DNS-ből eredő darabok ekvimoláris keverékéből kiindulva heteroduplex analízist végeztünk. A preparátum elektronmikroszkópos vizsgálata során találtunk



10. ábra. Az izolált BamHI fragmens homogenitásának ellenőrzése agaróz gélen



11. ábra. A két fág DNS-ből származó 3. BamHI fragmen-
sek között keletkezett heteroduplex molekula

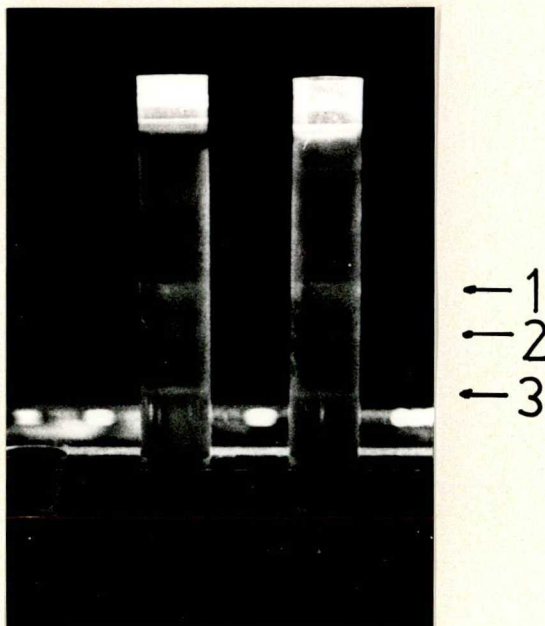
olyan heteroduplexeket, melyek igen kicsi, mintegy 100 bázispárra terjedő inhomogenitásra utaló hurkot tartalmaznak. Egy ilyen heteroduplex molekulát mutat a 11. ábra. Az ábrán látható DNS kontur hosszúság alapján mért molekulásúlya 5,7 MD; ez az érték megközelíti a 3. BamHI fragmens elektroforetikus elmozdulása alapján mért molekulásúlyát, ami $5,2 \pm 0,23$ MD értékűnek adódott.

A hurok a teljes méret 87 %-ánál helyezkedik el. Mivel a 3. BamHI fragmens teljes mértékben átfedi az A5-ös deléciót / 9. ábra /, ez a helyzet azt jelenti, hogy a hurok az A5-ös delécióval kiejtett DNS darabnak vagy a jobb, vagy a bal oldali végénél helyezkedik el. Az A5-ös deléciót tartalmazó fág Rm41 gazdán szaporítható, életfontosságú génjeit ez a deléció nem érinti. A hurok jelenléte tehát más fág funkció/k/ megváltozására utal.

Ilyen funkció lehet például a fág represszor fehérje, a beépülést és a kivágódást katalizáló int vagy xis gének termékei, valamint a fág att régiója, illetve ezek kombinációja.

3.5. Rm41 plazmid DNS izolálása és részleges jellemzése

A leírt módon izolált Rm41-ből származó tisztított DNS oldathoz annyi szilárd CsCl-t adtunk, míg az oldat

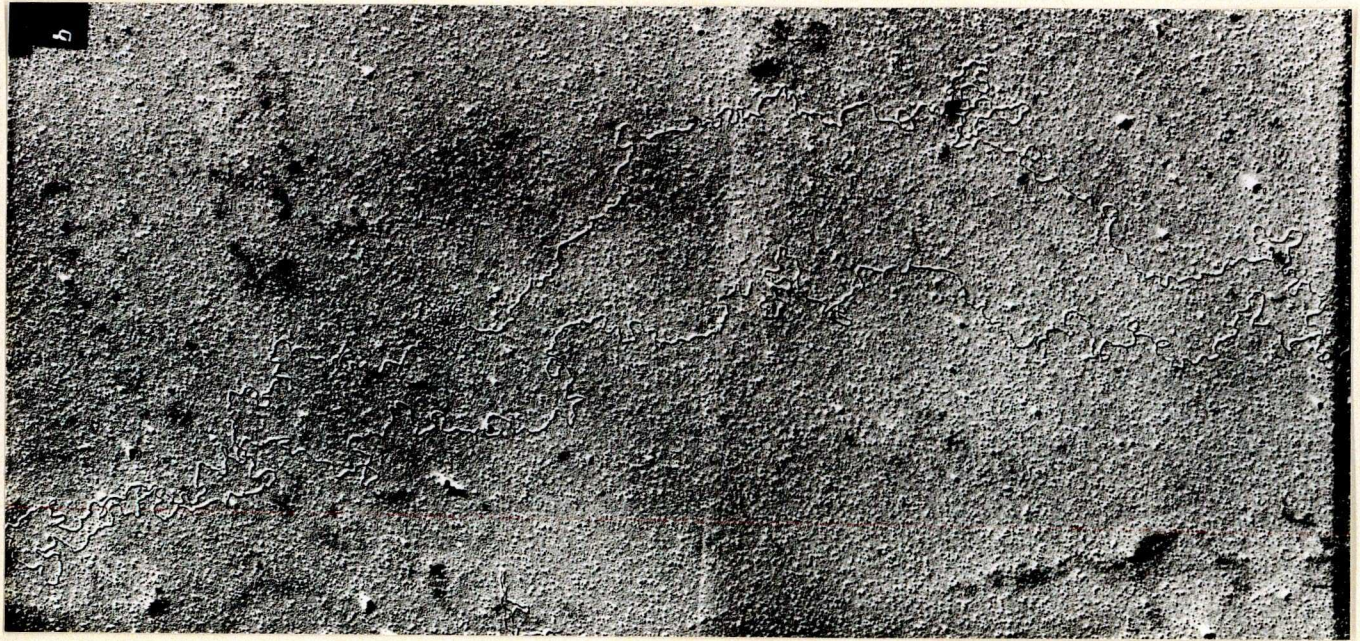


12. ábra. Centrifugacsövek CsCl grádiens centrifugálás után

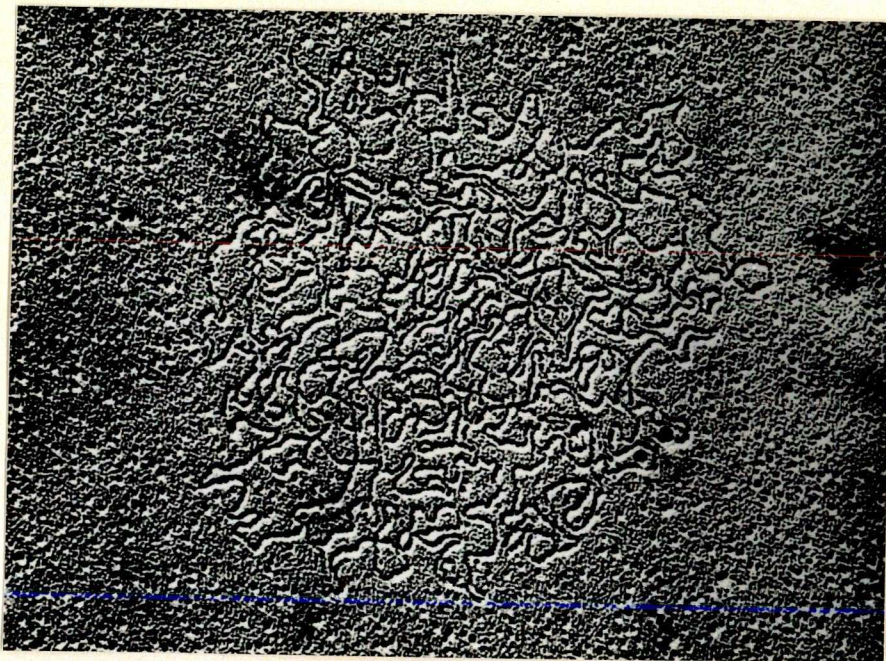


13. ábra. Lineáris töredék DNS az 1. sávból





14. ábra. O.C. pRM41



15. ábra. O.C. pRM41

sűrűsége a kívánt értéket elérte, valamint 10 ug/ml koncentrációban etidiumbromidot adtunk az oldathoz. 48 óra centrifugálás után a centrifugális erőterben beálló sűrűség grádiensen UV fény alatt három sávot tudtunk megkülönböztetni / 12. ábra /. UV lámpa alatt szeparáltuk a csövekből a fluoreszkáló sávokat; az azonos pozícióban levőket összeöntöttük, i-propa-nollal extraháltuk, majd dializáltuk az oldatokat. Dialízis után mindhárom sáv anyagtartalmát elektron-mikroszkóp alatt tanulmányoztuk. A legfelső, 1. sávban csak lineáris DNS darabokat találtunk ezzel a módszerrel, melyek kontur hosszúság alapján mért molekulasúlya 40-80 MD értékek közé esik, tehát viszonylag nagy méretűek / 13. ábra /. A középső, 2. sávban a lineáris DNS darabok mellett kör alakú molekulákat találtunk; ezek közül néhány kitekeredett és szétterült formájú / 14. ábra /, a többi felcsavarodott, zeg-zugos lefutású / 15. ábra /. A kitekeredett forma méretére jellemző, hogy a legkisebb, értékelhető nagyításban is csak két részletben tudtuk lefényképezni, és az előhívott pozitív képeket utólag vágtuk össze. Néhány molekula kontur hossz alapján mért molekulasúlya 140 MD körüli értékűnek adódott. Ezen plazmid molekulák kitekeredett alakjukat annak köszönhetik, hogy DNS láncukban kellő számú egyes szálú

törést tartalmaznak, ami lehetővé teszi ennek az alaknak a felvételét / OC molekulák /. Mivel ugyanebben a sávban felcsavarodott, zeg-zugos lefutású plazmid DNS molekulákat is találtunk, ebből arra következtettünk, hogy ezek is tartalmaznak egyes szálú töréseket, azonban ezek száma nem elegendő ahhoz, hogy a molekulák kitekeredhessenek.

A 2. frakcióban talált lineáris DNS molekulák jelenlétét az elektronmikroszkópos preparátumkészítés során fellépő óhatatlan kettős szálú törésekkel magyarázzuk.

A legalsó, 3. frakcióban ezzel a módszerrel semmit nem tudtunk kimutatni, a sáv anyagtartalmára nézve kísérleti adatunk nincs. Nem tartjuk kizártnak, hogy a preparátumkészítés során keletkező és nem teljes mértékben eltávolított egyes szálú DNS-t vagy RNS-t tartalmaz a sáv. Az sem lehetetlen, hogy a sáv az un. kovalensen zárt kör /CCC/ alakú, sértetlen molekulákat tartalmazza, mivel ez az alak CsCl grádiensen elválasztható az OC molekulától.

A kísérleti eredményekből kitűnik, hogy a középső, a második sáv Rm41 plazmid DNS-t tartalmaz, mivel kör alakú molekulákat csak itt találtunk. További analízisre van szükség az 1. sáv anyagtartalmára vonatkozólag, mivel elképzelhető, hogy az is zömében plazmid

eredetű DNS-t tartalmaz / 70. /. Ebben az esetben a DNS preparátum készítése garancia lenne, hogy az oldat plazmid eredetű DNS-t tartalmaz, és az időigényes, rendkívül drága CsCl grádiens centrifugálás bizonyos esetekben kiküszöbölhető lenne.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Kísérleteink első részében egy speciálisan és egy általánosan transzdukáló, a 16-3 és a 11-es fág DNS-ek összehasonlító biokémiai analizisét végeztük el.

Restrikciós enzimekkel hasítottuk a két DNS-t, majd agaróz gélelektroforézissel analizáltuk a keletkező fragmenseket. Ezek száma és helyzete mindkét fág DNS esetében ugyanaz volt. A kísérleti hibák határain belül nem tudtunk különbséget tenni a két fág genom között még abban az esetben sem, amikor ugyanazzal a restrikciós enzimmel vagy enzimek kombinációjával emésztett DNS keveréket futtattunk agaróz gélen. Az összes keletkezett fragmens száma és pozíciója megegyezett a külön-külön futtatott eredeti DNS-ekből keletkezett fragmensek számával és helyzetével.

Két, egymástól független módszerrel kimutattuk, hogy mindkét fág DNS ragadós végű.

Elektronmikroszkópos preparátum készítés után a DNS-ek kontúr hossz alapján mért molekulasúlya azonos volt; így sem tudtunk különbséget kimutatni a két genom között.

Az itt felsorolt eredmények világosan megmutatták, hogy a két genom közti különbség detektálásához sokkal nagyobb felbontóképességű módszerre van szükség, mint az eddigiek.

Egy ilyen módszer a heteroduplex analízis; ennek segítségével mintegy 50-100 bázispáryi különbség is detektálható.

Még mielőtt a heteroduplex analízist a két fág DNS-el elvégeztük volna, egy jól ismert deléciós mutáns, az A5-ös fág DNS és a 11-es fág DNS közötti heteroduplex molekulát készítettük el. Ennek oka az volt, hogy a deléción kívül eső, esetleg jelentkező, inhomogenitásra utaló helyeket lokalizálni tudjuk. Mivel a heteroduplex molekulák tanulmányozása során a deléciós hurkon kívül más, inhomogenitásra utaló jelet nem találtunk, ebből arra következtettünk, hogy ha van ki-mutatható különbség a két transzdukáló fág DNS között, akkor ez a delécióval érintett DNS régióra esik.

Találtunk egy olyan módszert, amivel ezt a DNS régiót izolálni tudtuk. A fragmensek felhasználásával heteroduplexet készítettünk; a preparátum tanulmányozása során találtunk olyan molekulákat, melyekben egy igen kicsi, mintegy 100 bázispár hosszúságú szakaszra kiterjedő hurok van. Azt eldönteni nem tudjuk, hogy ez a különbség melyik fág DNS-ből ered. Azonban logikusnak látszik, hogy ez a változás a 11-es fág DNS-t érinti.

Ezen a régióon belül történő inszerció vagy deléció következtében a két fág DNS nem teljesen homogén, ami-

nek következtében transzdukciós szempontból eltérő e két fág viselkedése.

A detektált különbség azonban mindössze 100-200 bázispárnnyi területen összpontosul. Ez a kis differencia azért is meglepő, mert a két fág eredete teljesen eltérő: a 16-3 fágot 1959-ben izolálták Balatonberényben, a 11-es fágot 1974-ben, Szegeden. Ehhez a sorhoz tartozik még a 36-os fág is, mely sok szempontból hasonló a 16-3-hoz illetve a 11-hez; ugyanakkor ezt a fágot Budapest környékén izolálták / 66. /.

Rendkívül meglepőnek látszik, hogy térben és időben távoli fág izolátumok ennyire konzervatívan megőrzik tulajdonságaikat.

Evolúciós szempontból ez talán úgy értékelhető, hogy ez az organizáció egyfajta optimumot jelent a környezeti szelekcióval szemben.

A 16-3 fág fizikai és genetikai térképének ismerete igen értékes információkat ad. Az A5-ös deléció teljesen kiejti a C gént, ami a 16-3 fág represszor proteinjét kódolja. Ha az általunk talált hurok a 3. BamHI fragmensek között a C gént érinti, abban az esetben a 11-es fág által termelt represszor funkcióját nem tudja teljes mértékben betölteni. Ennek következtében stabil lizogént nem képez a fág, ami korábbi vizsgálatok során kitűnt / 8. /, és kis gyakorisággal

tiszta tarfoltot képező mutánst is találhatunk az utódfágok között. A talált hurok nagysága következtében nem kizárt, hogy ez a mutáció más géneket is érintett.

A λ fág esetén az integráció a fág att régiójában oldalán elhelyezkedő promoter, valamint az int régió aktív részvételét igényli / 67. /.

Erre az analógiára támaszkodva és feltételezve a 16-3 fág esetén hasonló mechanizmus működését mondhatjuk, hogy e rendszer mutációja is okozhat hasonló jelenséget.

Vagy a regulátor, vagy az integrációért felelős rendszer, esetleg mindkettő sérülése nem zárja ki, hogy a 11-es fággal való fertőzés után általánosan transzdukáló fág részecskék keletkeznek.

Nem Hagyhatjuk figyelmen kívül annak a lehetőségét sem, hogy a 11-es fág att régiója sérült, ennek következtében a fág a gazdasejt kromoszómája mentén több helyen képes rekombinációra, majd "rossz" kivágódás után a gazda kromoszómájának több helyről származó darabjait képes átvinni.

Ebben az esetben egy nem klasszikus speciálisan transzdukáló fágként kell a Rm41 11-es fágját nyilvántartani.

A kísérletek második felében egy módszert állítottunk be a Rm41 plazmid tisztítására. Az alkalmazott

módszer sikerre vezetett, a CsCl grádiens centrifugálás után elkülönített fluoreszcens sávok egyikében cirkuláris DNS molekulákat találtunk, ami plazmid voltuknak közvetlen bizonyítéka. Ez a sáv minden igényt kielégítő munka elvégzésére alkalmas plazmid eredetű DNS-t tartalmaz.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az általánosan transzdukáló 11, és a speciálisan transzdukáló 16-3 fág DNS-ek összehasonlító analízise során azt találtuk, hogy néhány restriktációs enzimmel emésztve a keletkezett fragmensek száma és pozíciója azonos. Molekulasúlyukban sem így, sem elektronmikroszkópos mérésekkel különbséget kimutatni nem tudtunk.

Az A5-ös deléciós mutáns fág DNS-el készített heteroduplex-szel bizonyítottuk, hogy e két fág DNS között az A5-ös delécióval kiejtett DNS darabon feltételezhető különbség. Ennek a régiónak előállítása után heteroduplexet készítettünk a különböző eredetű DNS darabokkal. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy egy kb. 100-200 bázispárra terjedő hurok keletkezik. Jelenlétére több alternatív magyarázat lehetséges: a C gén sérült, az integrációért felelős enzimrendszer, vagy az att régió mutált.

Ezek a mutációk magyarázhatják a 11-es fág eltérő viselkedését a 16-3 fággal való összehasonlítás során.

Beállítottunk egy módszert, amivel a Rm41 plazmid tisztítható; a termékek feldolgozását elektronmikroszkóppal végeztük el.

6. IRODALOM

1. Sváb,Z., Kondorosi,Á., Orosz,L.:
Specialized Transduction of a Cystein Marker
by Rhizobium meliloti phage 16-3.
J. Gen. Microbiol. 106, 321-327 /1978/
2. Orosz,L., Sik,T.:
Genetic Mapping of Rhizobiophage 16-3.
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 17, 185-194
/1970/
3. Orosz,L., Sváb,Z., Kondorosi,A., Sik,T.:
Genetic Studies on Rhizobiophage 16-3 I.
Genes and Functions on the Chromosome.
Molec. Gen. Genet. 125, 341-350 /1973/
4. Dallmann,G., Orosz,L., Sain,B.:
Restriction Mapping of Temperate Rhizobium
meliloti Phage 16-3: Comparison of Genetic
and Physical Maps Indicates a Long, Geneti-
cally Silent Chromosomal Arm.
Molec. Gen. Genet. 176, 439-448 /1979/
5. Kiss,Gy., Dobó,K., Breznovits,Á., Orosz,L.,
Dusha,I., Kondorosi,A.:
Isolation and characterization of an R-prime
factor in Rhizobium meliloti.
J.Bacteriol., megjelenés alatt. /1979/
6. Kowalski,M.: Transduction in Rhizobium meliloti
Acta Microbiol. Polonica 16, 7-12 /1967/

7. Kowalski, M.:
Transducing Phages of *Rhizobium meliloti*
Acta Microbiol. Polonica, Ser. A. 2, 109-113
/1970/
8. Sik, T., Horváth, J., Misra, A.K., Chatterjee, S.:
The General Transduction of *Rhizobium meliloti*
XIV Intern. Congress of Gen., Contributed Pa-
per Sessions, Part I., pp 20.
9. Buchanan-Wollaston, V.:
Generalized Transduction in *Rhizobium legumi-*
nosarum.
J. Gen. Microbiol. 112, 135-142 /1979/
10. Casadesus, J., Olivares, J.:
General Transduction in *Rhizobium meliloti* by
a Thermosensitive Mutant of Bacteriophage DF 2.
J. Bact. 139, 316-317 /1979/
11. Poteete, A.R., Botstein, D.:
Purification and Properties of Proteins Essen-
tial to DNA Encapsulation by Phage P22.
Virology, 95, 565-573 /1979/
12. Botstein, D., Poteete, A.R.:
Formation of P22 Generalized Transducing Par-
ticles in Vitro.
Virology, 95, 574-576 /1979/

13. Heumann,W., Pühler,A., Wagner,E.:
The Two Transfer Regions of the *Rhizobium*
lupini Conjugation
MGG, 126, 267-274 /1973/
14. Haas, D., Holloway,B.W.:
R Factor Variants with Enhanced Sex Factor
Activity in *Pseudomonas aeruginosa*
Molec. Gen. Genet. 144, 243-251 /1976/
15. Kondorosi,A., Kiss,G.B., Forrai,T., Vincze,E.,
Bánfalvi,Z.:
Circular Linkage Map of *Rhizobium meliloti*
Chromosome.
Nature, 268, 525-527 /1977/
16. Meade,H.M., Signer,E.R.:
Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*
PNAS, 74, 2076-2078 /1977/
17. Helinsky,D.R.
Genetic Engineering for Nitrogen Fixation
Ed:A. Hollaender Basic Life Science, Vol. 9.
Plenum Press, New York, London, /1975/
18. Bazarol,M., Helinsky,D.R.:
Circular DNA Forms of Colicinogenic Factor
E1, E2, and E3 from *Eschericia Coli*
J. Mol. Biol. 36, 185-192 /1968/

19. Novick, R.P., Royston, C.C., Cohen, S.N., Curtiss, R.III., Datta, N., Falkow, S.:
Uniform Nomenclature for Bacterial Plasmids:
a Proposal
Bact. Reviews, 40, 168-189 /1976/
20. Crosa, J.H., Luttrop, L.K., Falkow, S.:
Nature of R-Factor Replication in the Presence
of Chloramphenicol
PNAS, 72, 654-659 /1975/
21. Silver, R.P., Falkow, S.:
Specific Labelling and Physical Characteriza-
tion of R-Factor Deoxyribonucleic Acid in
Escherichia coli
J.Bact. 104, 331- /1970/
22. Sciaky, D.
Fingerprints of Agrobacterium Ti Plasmids
Plasmid, 1, 238-253 /1978/
23. Drummond, M.:
Crown Gall Disease
Nature, 281, 343-347 /1979/
24. Casse, F.:
Személyes közlés
25. Southern, E.M.:
Detection of Specific Sequences Among DNA
Fragments Separated by Gel Electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503-517 /1975/

26. Nuti,M.P., Lepidi,A.A., Prakash,R.K., Schilpe-
rort,R.A., Cannon,F.C.:
Evidence for Nitrogen Fixation /nif/
Genes on Indogenous Rhizobium Plasmids
/1979, megjelenés alatt/
27. Luria,S.E.: Host-Induced Modifications of Viruses
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 18,
237-244 /1953/
28. Arber,W., Dussoix,D.:
Host Specificity of DNA Produced by Escherichia
coli I.
J. Mol. Biol. 5, 18-36 /1962/
29. Dussoix,D., Arber,W.:
Host Specificity of DNA Produced by Escherichia
coli II.
J. Mol. Biol. 5, 37-49 /1962/
30. Smith,H.O., Wilcox,K.W.:
A Restriction Enzyme from Haemophilus influenzae
J. Mol. Biol. 51, 379-391 /1970/
31. Jackson,D.A., Symons,R.H., Berg,P.:
Biochemical Method for Inserting New Genetic
Information into DNA of Simian Virus 40: Cir-
cular SV40DNA Molecules Containing Lambda
Phage Genes and the Galactose of Escherichia
coli
PNAS 69, 2904- /1972/

32. Hedgpeth, J., Goodman, A.M., Boyer, H.W.:

Nucleotide sequence Restricted by the RI
Endonuclease

PNAS, 69, 3448- /1972/

33. Cannon, F.C., Postgate, J.R.:

Expression of Klebsiella nitrogen fixation
genes /nif/ in Azotobacter

Nature, 260, 271-272 /1976/

34. Dixon, R.A., Cannon, F.C., Kondorosi, A.:

Construction of a P plasmid carrying nitrogen
Fixation genes from Klebsiella pneumoniae

Nature, 260, 268-271 /1976/

35. Cannon, F.C., Riedel, G.E., Ausubel, F.M.:

Recombinant plasmid that carries part of the
nitrogen fixation /nif/ gene cluster of Kleb-
siella pneumoniae

PNAS, 74, 2963-2967 /1977/

36. Cannon, F.C., Riedel, G.E., Ausubel, F.M.:

Overlapping Sequences of Klebsiella pneumoniae
nif DNA Cloned and Characterised

Molec. Gen. Genet. 174, 59-66 /1979/

37. Sik, T.:

Nem közölt eredmény

38. Sik, T.:

Kandidátusi értekezés, 1968

39. Adams, M.M.:

Bacteriophages

Interscience Publ. New York, London /1958/

40. Nuti, M.P., Ledebøer, A.M., Lepidi, A.A.,

Schilperoort, R.A.:

Large plasmids in different *Rhizobium* species

J. Gen. Microbiol. 100, 241-248 /1977/

41. Currier, T.C., Nester, E.W.:

Isolation of Covalently Closed Circular DNA

of High Molecular Weight from Bacteria

Anal. Biochem. 76, 431-441 /1976/

42. Flint, D.H., Harrington, R.E.:

Gel Electrophoresis of Deoxyribonucleic

Acid

Biochemistry 11, 4858-4863 /1972/

43. Aaij, C., Borst, P.:

The Gel Electrophoresis of DNA

BBA, 269, 192-200 /1972/

44. Helling, R.B., Goodman, H.M., Boyer, H.W.:

Analysis of Endonuclease R.EcoRI Fragments

of DNA from Lambdaoid Bacteriophages and

Other Viruses by Agarose-Gel Electrophoresis

J. Virol. 14, 1235-1244 /1974/

45. Sugden,B., De Troy,B., Roberts,R.J., Sambrook,J.:
Agarose Slab-Gel Electrophoresis Equipment
Anal. Biochem. 68, 36-46 /1975/
46. McDonell,M.W.,Simon,M.N., Studier,F.W.:
Analysis of Restriction Fragments of T7 DNA
and Determination of Molecular Weights by
Electrophoresis in Neutral and Alkoline Gels
J. Mol. Biol. 110, 119-146 /1977/
47. Jeffreys,A.J., Flavell,R.A.:
A Physical Map of the DNA Regions Flanking
the Rabbit -Globin Gene
Cell, 12, 429-439 /1977/
48. Baksi,K., Rogerson,D.L., Rushizky,G.W.:
Rapid, Single step Purification of Restriction
Endonucleases on Cibacron Blue F3-GA-
-Agarose
Biochemistry 17, 4136-4139 /1978/
49. Greene,P.J., Heyneker,H.L., Bolivar,F.,Rodriguez,R.L.,
Betlach,M.C., Covarrubias,A.A., Backman,K.,
Russel,D.J., Tait,R. and Boyer,H.W.:
A general method for the purification of restriction
enzymes
Nucl. Ac. Res. 5, 2373-2380 /1978/
50. Roberts,R.J.:
Restriction endonucleases
CRC Crit. Rew. Biochem. 4, 123-164 /1976/

51. Kleinschmidt, A.K., Zahn, R.K.:

Naturforsch. B. 14, 770-779 /1952/

52. Vollenweider, H.J., Sogo, J.M., Koller, T.:

A Routine Method for Protein-Free Spreading
of Double- and Single-Stranded Nucleic Acid
Molecules

PNAS, 72, 83-87 /1975/

53. Davis, R.W., Simon, M., Davidson, N.:

Electron Microscope Heteroduplex Methods
for Mapping Regions of Base Sequence Homology
in Nucleic Acids

Methods in Enz. XXI. 413-428

54. Mulder, C., Delius, H.:

Specificity of the Break Produced by Restricting
Endonuclease R1 in Simian Virus 40DNA,
as Revealed by Partial Denaturation Mapping

PNAS 69, 3215-3219 /1972/

55. Sharp, Ph.A., Ming-Ta Hsu, Ohtsubo, E., Davidson, N.:

Electron Microscope Heteroduplex Studies of
Sequence Relations among Plasmids of E. coli I.
J.Mol. Biol. 71, 471-479 /1972/

56. Sharp, Ph.A., Cohen, S.N., Davidson, N.:
Electron Microscope Heteroplex Studies of
Sequence Relations among Plasmids of E. coli II.
J. Mol. Biol. 75, 235-255 /1973/
57. Petterson, M., Mulder, C., Delius, H., Sharp, Ph.A.:
Cleavage of Adenovirus Type 2 DNA into Six
Unique Fragments by Endonuclease R.RI
PNAS, 70, 200-204 /1973/
58. Hu, S., Ohtsubo, E., Davidson, N., Saelder, H.:
Electron Microscope Heteroduplex Studies of
Sequence Relations Among Bacterial Plasmides
J. Bact. 122, 764-775 /1975/
59. Delius, H., Bünemann, H., Müller, W.:
The Isolation of DNA from Agarose Gels by
Electrophoretic Elution onto Malachite Greene-
-Polyacrilamide Columns
Gene, 4, 227-239 /1978/
60. Fuke, M., Thomas, C.A.Jr.:
Isolation of Opencircular DNA Molecules by
Retention in Agar Gels.
J. Mol. Biol. 52, 395-397 /1970/
61. Blin, N., Gabain, A.V., Bujard, H.:
Isolation of Large Molecular Weight DNA from
Agarose Gels for Further Digestion by Restric-
tion Enzymes
FEBS Letters 53, 84-86 /1975/

62. Thuring, R.W.J., Sanders, J.P.M., Borst, P.:
A Freeze-Squeeze Method for Recovering Long
DNA from Agarose Gels
Anal. Biochem. 66, 213-220 /1975/
63. Mark Finkelstein and Robert H. Rownd:
A Rapid Method for Extracting DNA from Agarose Gels
Plasmid. 1, 557-562 /1978/
Plasmid, 1, 557-562 /1978/
64. Orosz, L., Szekeres, M., Dallman, G., Sain, B.:
Phage 16-3 as a Potential Vector for Cloning
Rhizobium Genes
Multilat. Coop. Meeting on the Genetics of
Nitr. Fix.
Szeged, 1977
65. Orosz, L., Ascher, Z.:
Deletion and the Three point Map of Gene C
of Rhizobiophage 16-3
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 24, 89
/1977/
66. Dudás Brigitta: Személyes közlés
67. Kravehenko, V.V., Vasilenko, S.K., Grachev, M.A.:
A Rightward Promoter to the Left of the
Site of DNA
Gene, 7, 181-195 /1979/

68. Davidson,N., Szybalsky,N.W.:

Physical and Chemical Characteristics of
Lambda DNA. In: The Bacteriophage Lambda,
A.D.Hershey /ed./ p.74, Fig. 8.
Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor La-
boratory 1971

69. Beringer,J.E., Hopwood,D.A.:

Chromosomal recombination and mapping in
Rhizobium leguminosarum
Nature 264, 291-293 /1976/

70. Koncz,Cs.: Személyes közlés

Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm Dr. Sik Tibornak, hogy lehetővé tette e dolgozat elkészítését, figyelmemet a DNS kutatások irányába terelte, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, irányította.

Köszönetet mondok Kiss Ibolyának, Sain Bélának és Koncz Csabának, akik mindennapi munkám során fellépő problémák megoldásában nyújtottak nagy segítséget.

Köszönet illeti a Genetikai Intézet egész kollektíváját, mivel számomra egy teljesen új világ kezdeti megismeréséhez segítettek előadásaikkal, beszélgetéseikkel.