

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 090 B

(21) A bejelentés száma: 2563/87
(22) A bejelentés napja: 1987. 06. 04.
(30) Elsőbbségi adatok:
871 051 1986. 06. 05. US
(83) Letétbe helyezés: ATCC 39155; ATCC 39156;
NRRL B-18217; NRRL 18073; NRRL B-18047; NRRL
15880; NRRL B-15828; NRRL 15826; NRRL 15156;
NRRL 15042; NRRL 15041

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/31

(40) A közzététel napja: 1988. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991. 11. 28. SZKV 91/1

(72) Feltalálók:

Birmingham, Virginia Ann, Carmel, Indiana (US)
Seno, Eugene Thomas, Indianapolis, Indiana (US)

(73) Szabadalmas:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(54) **Eljárás Streptomyces és más mikroorganizmusok körében
alkalmazható új, tlrB jellel jelzett, tilozin rezisztenciát biztosító
gén előállítására és alkalmazására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás Streptomyces sejtekben tilozin rezisztenciát biztosító rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorok, valamint az ilyen vektorokat hordozó Streptomyces transzformánsok előállítására.

Úgy járnak el, hogy a Streptomyces fradiae eredetű tlrB gént hordozó dezoxi-ribonukleinsavat és egy

Streptomyces replikációs origót hordozó dezoxi-ribonukleinsav szakaszt ligálással összekapcsolnak, az így létrejött vektor dezoxi-ribonukleinsavat Streptomyces protoplasztokhoz adják, a transzformált protoplasztokat regenerálják, és regenerálás közben vagy ez után a transzformánsokat tilozin rezisztenciára szelektálják.

HU 204 090 B

A leírás a tlrB jellel jelzett, tilozin rezisztenciát biztosító génre, az e gént hordozó rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorokra és a tilozin rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsav vektorokat hordozó transzformánsokra vonatkozik. A tilozint a *Streptomyces fradiae* termeli, magát a tilozint az állatgyógyászatban állati növekedés-serkentőként és antibiotikumként alkalmazzák. A makrolid antibiotikumok közé tartozó tilozin egy 16 tagú laktongyűrűből és három cukorcsoporthból épül fel. Antibiotikus aktivitása, hasonlóan más makrolid antibiotikumokéhoz, a fehérje szintézis gátlásának köszönhető. A gátlás mechanizmusa abban áll, hogy a tilozin a riboszómához kötődik.

A tilozinnal szembeni rezisztenciát biztosító klónozó vektorok jól hasznosíthatók *Streptomyces* és más gazdasejtekben. A rekombináns dezoxi-ribonukleinsav technológia *Streptomyces*-ekben való fejlesztése és felhasználhatósága erősen függ attól, hogy rendelkezésre állnak-e szelektálható genetikai markerek a megfelelő klónozó vektorokon.

E fejlesztést mindeddig gátolta, hogy a jelenleg hozzáférhető, *Streptomyces*-ben használható szelektálható markerek száma kicsi. A találmány szerinti eljárás különféle fontos és értékes tekintetben, hogy kitágítja az ilyen célokra alkalmas szelektálható markerek körét. Különösen jól hasznosíthatók az itt közölt eljárás szerinti dezoxi-ribonukleinsav vektorok, mivel méretük kicsi, sokooldalúak, valamint sokféle tilozinra érzékeny *Streptomyces* sejtbe transzformálhatók és ott szelektálhatók.

A 0 176 319 A1 számú európai nyilvánossághozzatali irat rekombináns DNS klónozását ismerteti tlr A gén, mint szelektálható marker alkalmazásával, nem tesz azonban említést tlr B gén használatáról.

A *Streptomyces*-ek termelik a klinikailag jelentős antibiotikumok több mint felét, és így gazdaságilag fontos csoportot képviselnek. A jelen leírás új, és ebben a gazdaságilag jelentős csoportban jól használható rendszerekre és vektorokra vonatkozik, a leírás szerinti eljárás továbbá lehetővé teszi gének klónozását mind az ismert antibiotikumok hozamának növelése, mind új antibiotikumok és antibiotikum-származékok előállítására érdekében.

A találmány szerinti eljárás továbbá olyan dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorokra vonatkozik, melyek lehetővé teszik a *Streptomyces* transzformánsok szelektációját a nem transzformált sejtekkel szemben. A találmány szerinti vektor dezoxi-ribonukleinsavhoz nem szelektálható dezoxi-ribonukleinsavat kapcsolva, a módosított dezoxi-ribonukleinsav vektort *Streptomyces* sejtekbe transzformálhatjuk, és a transzformánsokat tilozin-rezisztens fenotípusuk alapján szelektálhatjuk. Mivel a transzformáció viszonylag kis gyakoriságú esemény, ezért jelentős értékű a gyakorlatban egy olyan vizsgálati módszer, amellyel meghatározhatjuk azokat a sejteket, melyek a több millió sejt közül felvették a transzformációra használt dezoxi-ribonukleinsavat.

A leírásban és az igénypontok megfogalmazása so-

rán az alábbi szakkifejezéseket használjuk:

ApR= ampicillin-rezisztens fenotípus, vagy az ezt biztosító gén.

mel= tirozináz gén.

5 Fazmid= fágként vagy plazmidként működő rekombináns DNS vektor.

rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor= bármely autonóm módon replikálódó vagy beépülésre képes elem, amely olyan dezoxi-ribonukleinsav molekulából épül fel, melyhez egy vagy több dezoxi-ribonukleinsav szakaszt lehet kapcsolni, illetve, melyhez ilyen már hozzákapcsoltak, ideértve — de nem limitáló jellel — a plazmidokat is.

15 Restriktív fragmens= egy vagy több restriktív enzim működése után létrejött bármely lineáris dezoxi-ribonukleinsav molekula.

Érzékeny gazdasejt= az adott antibiotikum jelenlétében, az adott antibiotikumra rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsav szakasz nélkül növekedésre képtelen gazdasejt.

20 TCR= tetraciklin-rezisztens fenotípus, vagy az ezt biztosító gén.

tlrA= „A” típusú, tilozin rezisztenciát biztosító gén.

tlrB= „B” típusú, tilozin rezisztenciát biztosító gén.

25 Transzformáns= transzformált gazdasejt.

Transzformáció= a genotípust megváltoztató dezoxi-ribonukleinsav bejuttatása a befogadó gazdasejtbe, a folyamat a befogadó sejt megváltozásához vezet.

30 tsrR= tiosztrepton-rezisztens fenotípus, vagy az ezt biztosító gén.

tyl= a tilozin bioszintézis egy génje.

Ismertetjük az ábrákat.

Az ábrák méretarányosak. Néhány restriktív enzim, mint például a SauIII A1 enzim esetén csak a fontosabb hasítási helyeket jelezzük.

35 1. ábra: a pSVB9 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

2. ábra: a pHJL315 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

40 3. ábra: a pSVB25 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

4. ábra: a pSFH62 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

5. ábra: a PSKC13 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

45 6. ábra: a pSFH60 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

7. ábra: a pSFH61 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

50 8. ábra: a pSVB36 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

9. ábra: a pSVB2 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

10. ábra: a pIJ903 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

55 11. ábra: a pSVB40 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

12. ábra: a pSVB47 plazmid restriktív és funkcionális térképe.

60 A tilozin rezisztenciát biztosító tlrB gén sok mikro-

organizmusban használható szelektálható markerként. A *tirB* gént a pSVB9 plazmidból lehet kivágni, egy 3,5 kb nagyságú BglII-SacI restrikciós fragmenssen. A pSVB9 plazmidot a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB9 törzsből különíthetjük el, e törzset az alábbi állandó törzsgyűjteményben helyeztük letétbe, NRRL 18073 sorszámon: Agricultural Research Service, Northern Regional Research Center (NRRL), Peoria, IL 61604, USA. A pSVB9 plazmid restrikciós és funkcionális térképét az 1. ábrán mutatjuk be. A pSVB9 plazmidot az 1. példában leírt eljárással lényegében megegyező módon lehet elkülöníteni az *S. lividans* TK23/pSVB9 törzsből. A *tirB* gént a pHJL315 plazmidból is kinyerhetjük, ez a plazmid az NRRL törzsgyűjteményben NRRL B-18047 sorszámon hozzáférhető.

A pHJL315 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 2. ábrán mutatjuk be.

A pSVB9 és a pHJL315 plazmid hasznos kiindulási anyagként használható fel más, a *tirB* gén által kódolt tilozin rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsav vektorok előállításához. Például a pSVB9 plazmid 3,35 kb méretű BglII-SacI tilozin rezisztenciát biztosító restrikciós fragmensét elkülöníthetjük és beépíthetjük a pIJ702 plazmid (ATCC 39155) nagyobb BglII-SacI restrikciós fragmensébe, miután megkapjuk a pSVB25 jelű plazmidot. A pSVB25 plazmid hordozza a *tirB* gént, és különböző mikroorganizmusokban tilozin rezisztenciát biztosít, amint azt alább részletesen leírjuk. A pSVB25 plazmid előállításának módszerét a 2. példában írjuk le, a plazmid restrikciós és funkcionális térképét pedig a 3. ábrán mutatjuk be.

A pHJL315 jelű plazmidszám, a *tirB* gént hordozó, a jelen találmány dezoxi-ribonukleinsav vektor hasznos kiindulási anyagként használhatjuk fel. A pHJL315 plazmidot BglII restrikciós enzimmel emésztjük, az így nyert 5,0 kb méretű, a *tirB* gént hordozó BglII restrikciós fragmenst a BamHI enzimmel emésztett pHJL401 jelű plazmidba építjük, amiután megkapjuk a pSFH62 és a pSFH63 jelű plazmidokat. A pHJL401 jelű plazmidot az alábbi számú európai szabadalmi leírás ismerteti: 213 779. A plazmid az NRRL törzsgyűjteményben férhető hozzá NRRL B-18217 sorszámon. A pSFH62 és a pSFH63 plazmidok csak az 5,0 kb méretű BglII restrikciós fragmens irányultságában különböznek, a pSFH62 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 4. ábrán mutatjuk be. Hasonló eljárással a pHJL315 plazmid 5,0 kb méretű *tirB*-t hordozó BglII restrikciós fragmensével szomszédos, 0,2 kb méretű BglII restrikciós fragmenst az 5,0 kb méretű fragmenssel együtt építjük be a BamHI enzimmel emésztett pHJL401 jelű plazmidba, így megkapjuk az 5,2 kb méretű, teljes inszert méretű pSKC13 plazmidot.

A pSKC13 plazmid restrikciós és funkcionális térképét az 5. ábrán mutatjuk be. A pSFH62, a pSFH63 és a pSKC13 plazmidok előállításának módszerét a 3. példában írjuk le.

A pSKC13 plazmidot KpnI restrikciós enzimmel emésztjük, a 3,8 kb méretű, a *tirB* gént tartalmazó

KpnI restrikciós fragmenst elkülönítjük, és beépítjük a KpnI enzimmel emésztett pUC19 plazmidba (ATCC 37,254). Így megkapjuk a pSFH60 és a pSFH60.1 plazmidokat. A két plazmid mindössze a 3,8 kb méretű KpnI fragmens irányultságában különbözik. A pSFH60 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 6. ábrán mutatjuk be. A pSFH60 3,8 kb méretű, a *tirB* gént hordozó EcoRI-HindIII restrikciós fragmensét elkülönítjük, és az EcoRI-HindIII enzimekkel emésztett pHJL401 plazmidba építjük be, amiután megkapjuk a pSFH61 plazmidot. A pSFH61 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 7. ábrán mutatjuk be. A pSFH60, a pSFH60.1, továbbá a pSFH 61 plazmidok előállításának módszerét a 4. példában adjuk meg.

A jelen leírás szerinti plazmidokat más dezoxi-ribonukleinsavak hozzáadásával könnyen még hasznosabb dezoxi-ribonukleinsav vektorokká alakíthatjuk át. Ennek illusztrációjaként a tilozin-rezisztenciát biztosító, a 176 319 számú európai szabadalmi leírásban leírt, *Streptomyces fradiae* eredetű *tirA* gént a pSVB25 plazmidhoz kapcsoljuk, miután megkapjuk a pSVB36 és a pSVB37 jelű plazmidokat. A pSVB36 és a pSVB37 plazmidokat a pSVB2 plazmid 2,86 kb méretű, a *tirA*-t tartalmazó BamHI-BglII restrikciós fragmensének a BglII enzimmel emésztett pSVB245 plazmidba való beépítésével állítjuk elő. A pSVB2 plazmid forrását, a *Streptomyces lividans* TK23 törzset NRRL 15880 sorszám alatt letétbe helyeztük. A két plazmid mindössze a 2,86 kb méretű restrikciós fragmens irányultságában különbözik. A pSVB36 restrikciós és funkcionális térképét a 8. ábrán mutatjuk be. A pSVB36 és a pSVB37 plazmidok előállításának módszerét az 5. példában adjuk meg.

A *tirB* gént kis másolatszámú *Streptomyces* dezoxi-ribonukleinsav vektorok előállítására is felhasználhatjuk. A pSVB25 plazmid 3,35 kb méretű, a *tirB*-t tartalmazó SstI-BglII restrikciós fragmensét az SstI-BamHI enzimekkel emésztett pUC19 plazmidba építjük, így a pSVB40 plazmidot kapjuk. A pSVB40 jelű plazmidot ezután EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel emésztjük, a 3,8 kb méretű, a *tirB*-t tartalmazó EcoRI-HindIII restrikciós fragmenst elkülönítjük, tisztítjuk, majd az EcoRI-HindIII enzimekkel emésztett pIJ903 jelű plazmiddal ligáljuk, amiután megkapjuk a pSVB47 jelű hibrid plazmidot. A pIJ903 plazmidot Lydiate és munkatársai írták le [Gene, 35, 223-235 (1985)]. A plazmid a John Innes Institute, Colney Lane, Norwich, Anglia, NR4-7UH *Streptomyces* törzsgyűjteményéből szerezhető be a 3471 sorszámon. A pIJ903 plazmid kópiaszáma *Streptomyces* sejtekben 1; a pSVB47 plazmid kópiaszáma hasonló. A pSVB40 és a pSVB47 plazmidok restrikciós és funkcionális térképét a 11. illetve a 12. ábrán mutatjuk be. A pSVB47 plazmid előállításának módszerét a 7. példában adjuk meg.

A találmányunkra jellemző, hogy a dezoxi-ribonukleinsav vektorok előállítására használt restrikciós fragmenseket az ismert módszerekkel módosíthatjuk is a ligálás elősegítése érdekében. Így például kapcsoló molekulákat illeszthetünk az adott tilozin rezisztencia

gént hordozó restriktív fragmenshez, vagy a vektor replikációját illetve beépülési funkcióját kódoló dezoxi-ribonukleinsavhoz. Így könnyen specifikus hasítási helyeket állíthatunk elő az ez után következő ligáláshoz. Az adott vektor továbbá különböző, a tilozin rezisztencia gént tartalmazó restriktív fragmenseit, replikációs kezdőpontját vagy pedig beépülést szolgáló szakaszait néhány nukleotid hozzáadásával, eltávolításával, vagy helyettesítésével úgy változtathatjuk meg, hogy a dezoxi-ribonukleinsav ligálására alkalmas, különféle restriktív hasítási helyeket hozunk létre. Az e területen járatos szakemberek a nukleotid-kémia és a genetikai kód ismeretében meghatározhatják, hogy milyen nukleotidok cserélhetők fel, és mely dezoxi-ribonukleinsav módosítások előnyösek egy adott cél elérése szempontjából. Említést érdemel az is, hogy a klónozó dezoxi-ribonukleinsav vektoron az adott tilozin rezisztencia gént hordozó restriktív fragmens beépítésének helye nem szigorúan meghatározott; amennyiben a beépítés a kritikus, a vektor által szabályozott funkciókat nem zavarja. Az e területen járatos szakemberek ismerik, illetve könnyen meghatározhatják egy dezoxi-ribonukleinsav vektor azon hasítási helyeit, melyek az adott tilozin rezisztencia gént tartalmazó restriktív fragmens ligálása illetve beépítése szempontjából előnyösek.

A *tirB* gént egy tilozint termelő *Streptomyces fradiae* törzsből különítjük el. *Streptomyces fradiae* genomális dezoxi-ribonukleinsavát részlegesen emésztjük *SauIII*A1 restriktív enzimmel, majd az így létrejött dezoxi-ribonukleinsavat a *BglII* enzimmel emésztett pIJ702 plazmidba építjük be, több *tirB*-t tartalmazó plazmidot, köztük a pSVB9 jelűt nyerve így. Hasonló módon eljárva, ugyanezen *S. Fradiae* törzs genomális dezoxi-ribonukleinsavát részlegesen emésztve *MboI* restriktív enzimmel is, és az így létrejött, *MboI* enzimmel emésztett dezoxi-ribonukleinsavat a pKC462A jelű plazmid *BamHI* helyére klónozzuk. A pKC462A plazmid az NRRL törzsgyűjteményből NRRLB-15973 sorszámon szerezhető be. A beépített dezoxi-ribonukleinsavat egy *EcoRI* restriktív fragmensevel együtt vágjuk ki a plazmidból, és a pHJL401 jelű plazmidba klónozzuk, amikor megkapjuk a pHJL315 plazmidot.

Mivel a *tirB* gént a *Streptomyces fradiae* sejtekből izoláljuk, a *tirB* gén a *Streptomyces fradiae*-ben működőképes, de a nem módosított gén más mikroorganizmusokban is megnyilvánul.

A leírás szerinti vektorokkal a *Streptomyces lividans* sejteket is transzformálhatjuk tilozin rezisztenciára szelektálva, amint azt a 6. példában megadjuk. A

tirB gént felhasználhatjuk több, egymástól különböző *Streptomyces*-törzs transzformálására is, tilozin rezisztenciára szelektálva. A *tirB* gén azonban nem biztosít rezisztenciát a *Streptomyces griseofuscus*-ban a tilozin nagyobb dózisaival szemben, ami arra utal, hogy a *tirB* gén promotere talán nem működik hatékonyan valamennyi gazdasejtben.

A pSVB9 és a pHJL315 plazmidok a teljes *tirB* gént hordozzák, vagyis:

1. a fehérjét kódoló szekvencia transzkripcióját irányító promotert;
2. azokat a szekvenciákat, amelyek a hírvivő ribonukleinsavvá való átírás után a hírvivő ribonukleinsav translációját irányítják;
3. a fehérjét kódoló szekvenciát; végül
4. a transzkripció terminátorát.

A fenti elemek mindegyike önállóan is jól használható, és a rekombináns dezoxi-ribonukleinsav technológia által kínált módszerekkel igen sokféle rekombináns gén előállítására használhatók fel. A pSVB9 plazmid 3,35 kb méretű *BglIII*-*SstI* restriktív fragmensének nukleotid sorrendjét meghatározva a *tirB*-t kódoló szekvenciák pontos elhelyezkedése is ismertté fog válni, ezáltal lehetővé válik más promóterek beillesztése a *tirB*-t kódoló szekvenciákkal azonos leolvadási fázisban. A megfelelő promóter megválasztásával olyan vektorok hozhatók létre, melyek bármely adott gazdasejtben alkalmasak a *tirB* gén termékének kifejezésére. A *tirB* gén promotere önmagában is hasznos. A *tirB* gén promotert, illetve egyéb szabályozó elemét egy, a tilozintól eltérő antibiotikum bioszintetikus génjéhez kapcsolva olyan hibrid gént hozhatunk létre, amely megnyilvánulhat a *Streptomyces fradiae*-ben, hibrid antibiotikum létrejöttét eredményezve. Így az itt leírt plazmidokon található gén egyes elemei is a találmány fontos részei.

- Habár a fent leírt vektorok a pIJ702, pIJ903 vagy a pHJL401 jelű plazmidok replikonjainak egyikét tartalmazzák, sok ismert *Streptomyces* replikon használható egyaránt hasznos, eltérő gazdasejt-specifitású vektorok előállítására. Az I. táblázat egy szemléltető jellegű, ha nem is átfogó listát mutat azokról a *Streptomyces* plazmidokról, melyekből a *Streptomyces* replikonok nyerhetők. Az e területen járatos szakemberek felismerik, hogy e plazmidok egészét, vagy egy részét mindaddig felhasználhatjuk, míg a jelen találmány szerinti *tirB* gént hordozó vektorok előállítására törekszünk, és amíg a replikon működését nem akadályozzuk. A plazmidot hordozó gazdatörzset, illetve a letét sorszámát szintén feltüntettük az alábbi I. táblázatban.

I. táblázat
Streptomyces plazmidok

Plazmid	Gazdasejt	Hivatkozási szám
SCP2	Streptomyces coelicolor A3 (2)	NRRL 15042
SPP2*	Streptomyces coelicolor M110	NRRL 15041
pEL7	Streptomyces ambofaciens/pEL7	NRRL 12523
pUC6	Streptomyces espinosus	NRRL 11439
pUC3	Streptomyces 3022A	NRRL 11417
SLP1	Streptomyces lividans	NCIB* 11417
pNM100	Streptomyces virginiae	NRRL 15156
pEL103	Streptomyces granuloruber A399 12.12/pEL103	NRRL 12549
pIJ702	Streptomyces lividans	ATCC** 39115

*= National collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torrey Research Station, Post Office Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB98DB, Skócia, Egyesült Királyság.

**= American Type Culture Collection, Rockville, MD20852.

Természetesen a *tlrB* gént nemcsak plazmid jellegű dezoxi-ribonukleinsav vektorok előállítására lehet felhasználni. A jól ismert *Streptomyces* fág, a ϕ C31 kiváló kiindulási anyagul szolgál beépülésre képes, tilozin rezisztenciát biztosító vektorok előállításához, melyek további példákkal szemléltetik a jelen találmányt. A ϕ 31 fág egy származéka, az *E. coli* K12 BE447/pKC331 (NRRL B-15828) törzsből nyerhető pKC331 fazmid különösen alkalmas ilyen beépülésre képes vektorok előállítására. A ϕ C31 típusú fágok beépülési vektorok, ezek könnyen módosíthatók úgy, hogy a *tlrB* gént beépítve tilozin rezisztenciát biztosítsanak *Streptomyces* sejtekben.

A jelen találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsav vektorok egy *Streptomyces* replikációs origóból és egy tilozin rezisztenciát meghatározó restriktós fragmensből állnak. Mivel a plazmidok amplifikálása és a plazmidokkal végzett egyéb munkák gyorsabban és hatékonyabban végezhetők *E. coli* sejtekben mind *Streptomyces*-ekben, ezért célszerű *E. coli*-ban való replikációt lehetővé tevő dezoxi-ribonukleinsav szakaszokat kapcsolni a vektorokhoz. Így különösen előnyös az *E. coli* plazmidokból, mint például a pBR322-ből, a pACYC184-ből, a pBR325-ből, a pBR328-ből és más, hasonló plazmidokból származó, működőképes replikációs origót tartalmazó és antibiotikum-rezisztenciát meghatározó restriktós fragmensek beépítése, amely hozzájárul a találmány szerinti, szemléltető jelleggel bemutatott vektorok széles körű felhasználhatóságához is.

A találmány szerinti eljárás során használt dezoxi-ribonukleinsav vektorok tilozin rezisztenciát biztosítanak tilozinra érzékeny *Streptomyces* vagy azzal rokon gazdasejtekben. Míg a tilozin általában 10 μ g/ml koncentrációban toxikus a tilozinra érzékeny *Streptomyces* sejtekre, addig a találmány szerinti vektorok a 10 mg/ml-es tilozin-koncentrációt megközelítő rezisztenciát biztosítanak. *Streptomyces lividans*-sejtekkel dolgozva, a szelekció céljából előnyös tilozin-koncentráció 500 μ g/ml. Más tilozinra érzékeny mikroorganizmusok esetén a szelekció céljából előnyös tilozin-koncentrációt a szakirodalomból ismert mód-

szerek szerint eljárva könnyen meghatározhatjuk: ez az érték a *tlrB* gén kifejezésére használt promotertől és a mikroorganizmus tilozin-érzékenységétől függ.

A *tlrB* gén tilozin-rezisztenciát határoz meg, de más antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát is biztosíthat. A makrolid antibiotikumokkal, mint például a tilozinnal és az eritromicinnel szembeni, indukálható rezisztencia a gram-pozitív festődésű baktériumoknál (például *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Streptococcus* és *Bacillus*) a linkózamid és B-típusú sztreptogramin antibiotikumokkal szembeni korezisztenciával kapcsolatos: ezt a többszörös rezisztencia fenotípust MLS-rezisztencia fenotípusnak nevezik [Fujisawa és Weisblum, *J. Bacteriol.*, 146, 621-631 (1981)]. A *Staphylococcus aureus*-nál az MLS-rezisztencia fenotípus egy, a 23S riboszomális ribonukleinsavban (rRNS-ben) N⁶-dimetil-adenin keletkezéséhez vezető, specifikus adenin-metilácó következménye. Sok *Streptomyces* faj, melyek jobbára MLS-antibiotikumokat termelnek, MLS-rezisztens fenotípusú. E fajok rRNS-e N⁶-monometil-adenint, N⁶-dimetil-adenint vagy mindkettőt tartalmaz. Az eritromicint termelő *Streptomyces erythreus*-nál az MLS-rezisztencia a 23S riboszomális ribonukleinsav egyetlen adenincsoportjának N⁶-dimetilációjának eredménye. Thompson és munkatársai egy olyan *S. erythreus* gént klónoztak, amely a *Streptomyces lividans*-ban eritromicin-rezisztenciát biztosított a 23S riboszomális ribonukleinsav N⁶-dimetilációja útján. Igen valószínű és várható, hogy a *tlrB* gén MLS-rezisztencia fenotípust határoz meg.

A *Streptomyces lividans* TK23 törzs a *tlrB* gént hordozó transzformánsok szelekciójára használt koncentrációknál (500 μ g/ml) érzékeny a tilozinra. A TK23 törzs azonban valószínűleg rendelkezik egy belső eredetű, MLS-rezisztenciát biztosító rendszerrel is. Az előkísérletekben a TK23 törzs a tilozin kis koncentrációira (= 25 μ g/ml) is érzékeny volt, de a 21 μ g/ml tilozinnal történő előkezelés 100 μ g/ml tilozin-koncentrációig terjedő rezisztenciát indukált. A belső eredetű MLS-rendszer azonban alkalmazatlan a klónozott *tlrB* gén szelekciójánál használt tilozin-koncent-

rációkkal szembeni rezisztencia biztosítására.

A találmány szerinti rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorok széles körben alkalmazhatók, valamint segítséget nyújtanak a megfelelő *Streptomyces* sejtekben és más, rokon élőlényekben alkalmazható klónozó vektorok iránt mutatkozó igények kielégítésében. Továbbá, az ilyen dezoxi-ribonukleinsav vektorok által meghatározott tilozin-rezisztencia módot nyújt a transzformánsok szelektálására. Ez annak a gyakorlati követelménynek a szempontjából fontos, hogy meghatározhassuk és kiválaszthassuk a transzformációs eljárás során a vektor dezoxi-ribonukleinsavat felvett sejteket.

Olyan további dezoxi-ribonukleinsav szakaszokat is beépíthetünk az ilyen vektorokba, melyek jelenlétét működésük alapján vizsgálni nem tudjuk, és a nem szelektálható dezoxi-ribonukleinsavat hordozó transzformánsokat a tilozin rezisztenciára történő szelekcióval különítjük el.

Az ilyen, nem szelektálható dezoxi-ribonukleinsav szakaszokat a plazmid működése és replikációja szempontjából szükséges, illetve a *trb* génen belüli szakaszok kivételével bármely helyre beépíthetjük, így például, ha nem is kizárólag, az antibiotikumokat módosító enzimeket kódoló génekbe, illetve bármely típusú regulációs génbe.

Részletesebben szólva, egy gént hordozó, nem szelektálható dezoxi-ribonukleinsav szakaszt építhetünk egy plazmidba, mint például a pSVB9 plazmidba a *tiosztrepton* rezisztencia gén közepén található *Cl*I restriktions helyre. Ez a beépülés inaktíválja a *tiosztrepton*-rezisztencia gént, így lehetővé téve a rekombináns plazmidot hordozó transzformánsok könnyű azonosítását. Ezt a következőképpen végezzük: Először tilozin-rezisztenciára szelektálunk, majd ezután azonosítjuk azokat a tilozin-rezisztens transzformánsokat, melyek nem rezisztensek a *tiosztrepton*ra. Így az a lehetőség, hogy *Streptomyces* sejtekben és más, rokon mikroorganizmusokban tilozin-rezisztenciára szelektálhatunk, módot nyújt azoknak a különösen ritka sejteknek az elkülönítésére, melyek az adott vizsgálandó, nem szelektálható dezoxi-ribonukleinsavat hordozzák.

A tilozin-rezisztencián alapuló, fentebb leírt funkcionális vizsgálat az egyes antibiotikum-rezisztenciát meghatározó gének szabályozó elemeiként szolgáló, illetve az ezek kifejeződését irányító dezoxi-ribonukleinsav szakaszok helyének a megállapítására is felhasználható. Az ilyen szakaszok — ideértve, bár nem kizárólag a promotereket, attenuátorokat, represszorokat, indukciós szakaszokat, riboszóma kötőhelyeket és hasonlókat — ellenőrzik *Streptomyces* sejtekben és a rokon mikroorganizmusokban más gének kifejeződését is. A jelen leírás szerinti, tilozin-rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsav vektorok felhasználhatók annak biztosítására is, hogy a kapcsolt dezoxi-ribonukleinsav szakaszok a gazdasejtekben több generáción át fennmaradjanak. A *Streptomyces* sejtekben a tilozin rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsavhoz kovalensen kapcsolva az ilyen gének vagy dezo-

xi-ribonukleinsav fragmensek úgy maradnak fenn, hogy a transzformánsokat a nem transzformált sejtekre toxikus tilozin-koncentrációkat tartalmazó táptalajokon tartjuk fenn.

5 A vektort, következésképpen bármely kovalensen kapcsolt dezoxi-ribonukleinsavat elvesztett transzformánsok így nem növekedhetnek, és kipusztulnak a tenyészetből. A jelen találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsav vektorok tehát stabilizálhatnak és fenntarthatnak bármely vizsgálandó dezoxi-ribonukleinsavszakaszt.

10 A találmány szerinti klónozó dezoxi-ribonukleinsav vektorok és transzformánsok a *Streptomyces* és a rokon sejtek által jelenleg is termelt különféle termékek hozamának növelésére alkalmas gének klónozására is felhasználhatók. Nem kizárólagosan ugyan, de ilyen termékként sorolhatjuk a sztreptomicint, a tilozint, a cefalosporinokat, az aktaplanint, a narazint, a monenzint, a tobramicint, az eritromicint és más, hasonlókat. A találmány szerinti szelektálható vektorok szintén alkalmasak a gazdasági szempontból fontos fehérjéket, például az emberi inzulint, a humán proinzulint, a glukagont, az interferont és hasonlókat, valamint a gazdasági szempontból fontos átalakítások, illetve vegyületek anyagcsere útjaiban szerepet játszó 25 enzimeket, illetve a gének kifejeződését követő szabályozó elemeket meghatározó dezoxi-ribonukleinsav szakaszok klónozására jellemzésére és átalakítására. Az ilyen előnyös dezoxi-ribonukleinsav szakaszok közé tartoznak, bár nem kizárólagosan, az antibiotikum-származékok, mint például a sztreptomicin-, cefalosporin-, tilozin-, aktaplanin-, narazin-, monenzin- és eritromicin-származékok szintézisét katalizáló enzimeket, valamint az antibiotikum és más termékek biológiai előállításában szereplő, illetve az azt növelő 35 enzimeket kódoló dezoxi-ribonukleinsavak. Az ilyen dezoxi-ribonukleinsav szakaszok elkülöníthetősége és felhasználhatósága lehetővé teszi a *Streptomyces*-ek és a rokon mikroorganizmusok által termelt antibiotikumok hozamának illetve kitermelésének növelését.

40 A *Streptomyces* sejteket számos módon, több, különböző összetételű táptalaj bármelyikét felhasználva tenyészthetjük. A táptalaj előnyös szénhidrát-forrásai közé tartozik például a melasz, glükóz, dextrin és a glicerin. A nitrogén-források körébe pedig például a szójaliszt, az aminosav-keverékek és a peptonok tartoznak.

50 A *streptomyces*-ek a táptalajból szervesen sókat is felhasználhatnak, mint például nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium-, foszfát-, klorid-, szulfát- és hasonló ionok felszabadulását eredményező szokásos sókat. Minthogy más mikroorganizmusok növekedéséhez és egyedfejlődéséhez is nélkülözhetetlenek, így esszenciális nyomelemeket szintén adunk a táptalajokhoz. Ezek a nyomelemek általában a táptalaj egyéb 55 összetevőivel együtt járó szennyeződésként kerülnek a táptalajba.

60 A *Streptomyces*-ek levegőztetett körülmények között, viszonylag széles, 5–9-ig terjedő pH intervallumban, 15 °C és 40 °C hőmérsékleti tartományban növe-

kednek. A plazmidok stabilitása és fennmaradása szempontjából kívánatos kezdetben 7,2 pH-jú tenyésztő táptalajt használni, és a tenyésztési hőmérsékletet 30 °C-on tartani.

A következő példák tovább szemléltetik a jelen találmány szerinti eljárást. A találmány oltalmi körét a következő példák nem korlátozzák, a vegyszerek és az eszközök forrásait is pusztán tájékoztatásul közöljük, így ezek semmiképpen sem limitálják a találmány oltalmi körét. A találmány szerinti eljárás megvalósításainak értelmezését, illetve aktuális módszereit ott írjuk le, ahol ez szükséges.

1. példa

A pSVB9 plazmid elkülönítése

A) A *Streptomyces lividans* TK23/pSVB9 törzs tenyésztése

10⁸ *Streptomyces lividans* TK23/pSVB9 (NRRL 18073) spórával oltunk 10 µg/ml tiosztrepton tartalmazó, 10 ml térfogatú TSB táptalajt. A táptalaj (Trypticase Soy Broth) a következő összetételű:

30 g/l koncentrációjú oldatot készítettünk a Bethesda Research Laboratories (BRL) Inc., 8717 Grovemont Circle, P.O. Box 577, Gaithersburg, Maryland 20760 termékéből. A tenyészetet 29 °C hőmérsékleten a korai stacioner fázis eléréséig növesztjük. A tenyészetet ezután homogenizáljuk, és 5 ml homogenizált tenyésztel oltunk 100 ml, szintén tiosztrepton tartalmazó TSB jelű táptalajt. A 100 ml térfogatú tenyészetet 29 °C hőmérsékleten inkubáljuk, amíg a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB9 sejtek eléri a stacioner fázist.

B) A plazmid elkülönítése

A sejteket összegyűjtjük és 10,3%-os szacharóz-oldattal egyszer mossuk. Ezután 24 ml, 10,3%-os szacharóz-oldatban szuszpendáljuk a sejteket, és 6 ml 5x lizozim-oldatot adunk hozzá (az oldat összetétele a következő:

125 mM trisz-hidro-klorid pH=8,0,

125 mM dinátrium-etilén-diamin-tetraecetsav, pH= 8,0,

10 mg/ml lizozin,

10,3% szacharóz).

A szuszpenziót összekeverjük, 30 °C hőmérsékleten 30–60 percen át inkubáljuk, majd körülbelül 18 ml, 0,3 mólos nátrium-hidroxid-oldatot és 1% nátrium-lauril-szulfátot tartalmazó, 50 °C hőmérsékletre előmelegített oldatot adunk hozzá, keverjük, és az így nyert elegyet 80 °C-on 10 perce ná inkubáljuk. Ezután szobahőmérsékletre hűtjük az elegyet, majd hozzáadunk 500 g fenolból, 500 g kloroformból, 0,5 g 8-hidroxi-kinolinból és 200 ml vízből készült elegy 12 ml-ét. Ezután jól összekeverjük a sejt kivonattal. A fázisokat 6000–8000 perccenkénti fordulatszámú rotorban 10 percen át végzett centrifugálással elválasztjuk, és az így kapott felülúszó 45 ml-ét tiszta centrifugacsöbe töltjük.

4,5 ml 3 mólos nátrium-acetátot és 50 ml izopropánolt adunk a felülúszóhoz, az oldatot összekeverjük és szobahőmérsékleten hagyjuk állni 30 percen át. Centrifugáljuk az oldatot (8000 fordulat/perc, 30 percen

át), a kapott felülúszót pedig kiöntjük. A csapadékot 7,5 ml, 8 g cézium-kloridot tartalmazó TE jelű pufferban oldjuk fel. A TE jelű puffer összetétele a következő:

5 10 mM trisz-hidro-klorid, pH= 8,0,
1 mM etilén-diamin-tetraecetsav.

0,5 ml 10 mg/ml koncentrációjú etidium-bromid-oldatot adunk az elegyhez, és az így kapott oldatot perccenként 40.000-et forduló centrifugában centrifugáljuk 48 órán át. A plazmid-csíkot tartalmazó frakciót 3–5-ször extraháljuk TE-pufferral, és cézium-kloriddal telített izopropanollal, az etidium-bromid eltávolítása érdekében. Az extrakció után a mintát 4 térfogat TE-pufferral hígítjuk, majd 2 és fél térfogat etanol adunk hozzá. Az így nyert elegyet összekeverjük, és –20 °C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáljuk.

Az egy éjszakán át tartó, –20 °C hőmérsékleten kivitelezett inkubáció alatt keletkező csapadékot centrifugálással (10.000 fordulat/perc, 30 perc) gyűjtjük össze, megszáritjuk és kétszer újra kicsapjuk.

A kicsapások során a csapadékot TE-pufferban oldjuk, nátrium-acetát-oldatot adagolunk addig, míg a végkoncentráció 0,3 M lesz, ezután 2,5 térfogat etanolal keverjük, 10–15 percen át –70 °C hőmérsékleten tároljuk, majd pedig a fentiek szerint centrifugáljuk az elegyet. A módszer körülbelül 100 µg pSVB9 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat eredményez, amit TE-pufferban oldunk úgy, hogy koncentrációja 1 µg/µl legyen, az oldatot ezután 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

2. példa

pSVB25 plazmid előállítás

Az 1. példában leírtakat ismétéljük meg, a *Streptomyces lividans*/pIJ702 (ATCC 39155) törzs tenyésztésére és elkülönítjük a pIJ702 plazmidot. Tiosztrepton szelekcióval (10 µg/ml) biztosítjuk a pIJ702 plazmid fennmaradását. Az így nyert 100 µgnyi mennyiségű pIJ702 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 1 ml TE-oldatban feloldjuk és 4 °C hőmérsékleten tároljuk.

500 ng (5 µl) pIJ702 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk a 2 µl 10X SacI puffert, 12 µl vizet és 1,5 µl (15 egység az egységek definíciója itt megfelel a New England Biolabs, 32 Road, Beverly, MA 01915-9990 definícióinak, hacsak másként nem jelezzük) SacI enzimet, az SstI restriktációs enzim izoskizomerjét tartalmazó oldathoz. A 10X SacI puffer összetétele a következő:

50 60 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,4,

60 mM magnézium-klorid,

60 mM 2-merkapto-etanol,

1 mg/ml borjú szérum albumin (BSA).

Az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk, ekkor 3 µl reakcióelegyet mintául véve, agaróz gél-elektroforézis segítségével határozzuk meg az emésztés teljességét.

4 µl 10X BglII puffert, 16 µl vizet és 2 µl (16 egység) BglII restriktációs enzimet adunk a SacI enzimmel emésztett pIJ702 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-ol-

dathoz, és az így nyert reakcióelegyet 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A 10X BglIII puffer összetétele a következő:

- 1,0 M nátrium-klorid,
- 10,0 mM trisz-hidro-klorid, pH=7,4,
- 10,0 mM magnézium-klorid,
- 100,0 mM 2 merkaptó-etanol,
- 1,0 mg/ml borjú szérum albumin.

6 µl reakcióelegyet mintául véve, ellenőrizzük az emésztés tejjességét. Ezután összegyűjtjük a SacI-BglIII enzimekkel emésztett dezoxi-ribonukleinsavat úgy, hogy a reakcióelegy nátrium-acetát koncentrációját 0,3M-ra állítjuk, 2 térfogat etanolt adunk hozzá, és a reakcióelegyet -70 °C hőmérsékletre hűtjük. A kicsapódott dezoxi-ribonukleinsavat centrifugálással kiülepítjük.

A BglII-SacI enzimekkel emésztett pIJ702 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 100 µl 50 mM trisz-hidro-kloridot (pH=8,0) tartalmazó oldatban oldjuk. A dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz µl 50 mM trisz-hidro-kloriddal, pH=8,0 1:100 arányban hígított tartalmazó oldatban oldott borjú intesztinális alkalikus foszfátáz enzimet adunk (Boehringer-Mannheim). A kapott reakcióelegyet 30 percen át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A reakciót a reakcióelegy 70 °C hőmérsékleten 1 órán át történő inkubálásával állítjuk le.

25 µl TE-pufferban oldott 625 ng mennyiségű pSVB9 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 6 µl 10X SacI pufferből, 26 µl vízből és 2 µl (20 egység) SacI restrikciós enzimből álló elegyhez adunk, és az így nyert reakcióelegyet 1 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten. 3 µl 1 mólos nátrium-klorid-oldatot és 2 µl ClaI restrikciós enzimet adunk a reakcióelegyhez, és 1 órán át 37 °C hőmérsékleten folytatjuk az inkubálást.

A ClaI enzimmal történő emésztés csökkenti a pSVB25 plazmid előállításához vezető ligálás során a nem-kívánatos ligációs termékek keletkezésének gyakoriságát. 8 µl reakcióelegyet agaróz gélen elektroforézálunk abból a célból, hogy ellenőrizzük az emésztés teljességét, majd 1 µl 1 mólos nátrium-klorid-oldatot és 1 µl (8 egység) BglIII restrikciós enzimet adunk a ClaI-SacI enzimekkel emésztett dezoxi-ribonukleinsav-oldat maradékához. A reakcióelegyet további 1 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten. 8 µl reakcióelegyet mintául véve, ellenőrizzük a BglIII emésztés teljességét.

77 µl BglIII-SacI enzimmal emésztett alkalikus foszfátázzal kezelt pIJ702 dezoxi-ribonukleinsavat adunk a BglIII-SacI-ClaI enzimekkel emésztett pSVB9 dezoxi-ribonukleinsavból, 11 µl 3 mólos nátrium-acetát-oldatból és 300 µl vízmentes etanolból álló elegyhez. Az oldatot összekeverjük, -70 °C hőmérsékleten 30 percen át fagyasztjuk, majd centrifugálással kiülepítjük a dezoxi-ribonukleinsavat. A dezoxi-ribonukleinsavat 12 µl 1X ligáz-pufferban oldjuk. A puffer összetétele a következő:

- 50 mM trisz-hidro-klorid, pH=7,8,
- 10 mM magnézium-klorid,
- 20 mM ditio-treitol (DTT),
- 1,0 mM adenozin-trifoszfát,

50 µg/ml borjú szérum albumin.

A dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz 1 egység (1 µl) Boehringer-Mannheim T4 dezoxi-ribonukleinsav ligáz enzimet adunk, és az így nyert reakcióelegyet 1 éjszakán át inkubáljuk 15 °C hőmérsékleten.

A ligált dezoxi-ribonukleinsav az előállítani kívánt pSVB25 jelű plazmid dezoxi-ribonukleinsav.

A pSVB25 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 3. ábrán mutatjuk be. A ligált dezoxi-ribonukleinsavval transzformáljuk a *Streptomyces lividans* TK23 törzs sejtjeit, ahogy azt az alábbiakban következő, 6. példában megadjuk.

A *Streptomyces lividans* TK23/pIJ702 transzformánsokat a transzformációs lemezekre a telepek szín alapján különböztetjük meg a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB25 transzformánsoktól. A pIJ702 plazmid ép tirozináz gént hordoz, így a *Streptomyces lividans* TK23/pIJ702 transzformánsok tirozint tartalmazó lemezekre fekete színűek. A tirozináz gént a pSVB25 plazmid előállítása során inaktiváljuk, így a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB25 transzformánsok nem lesznek fekete színűek tirozint tartalmazó táptalajon.

3. példa

A pSFH62, a pSFH63 és a pSKC13 plazmidok előállítása

A pSFH 62, a pSFH 63 és a pSKC13 plazmidok előállításához használt plazmid dezoxi-ribonukleinsavat az *E. coli* K12 JM109/pHJL315 törzsből nyerjük, a következők szerint eljárva. Ez a módszer a Maniatis és munkatársai által írt *Molecular Cloning* (1982) [Cold Spring Harbor Laboratory] című könyvben leírt eljárás egyik alkalmazása. Ugyanezt a módszert alkalmazzuk a találmány szerinti különféle *E. coli* transzformánsok azonosítására használt plazmid dezoxi-ribonukleinsavak előállításához, csak kisebb méretben és az ultracentrifugálást fenolos, majd kloroformos extrakcióval helyettesítve.

500 ml stationer növekedési fázisú *E. coli* K12JM109/pHJL315 tenyészetből 4000 xg-n 4 °C hőmérsékleten 10 percen át centrifugálva gyűjtjük össze a sejteket, a felülúszót kiöntjük. A sejttöledéket 100 ml jéghideg STE jelű pufferral mossuk. A puffer összetétele a következő:

- 0,1 M nátrium-klorid,
- 10,0 mM trisz-hidro-klorid, pH=7,8,
- 1 mM etil-diamin-tetraecetsav.

A sejtek mosása után 10 ml, 5 mg/ml lizozim enzimet tartalmazó 1. számú oldatban szuszpendáljuk a sejteket, és 10 percen át szobahőmérsékleten hagyjuk állni a szuszpenziót. Az 1. számú oldat összetétele a következő:

- 50 mM glükóz,
- 25 mM trisz-hidro-klorid, pH=8,0,
- 10 mM etilén-diamin-tetraecetsav.

A lizozimmal kezelt sejtekhez ezután 20 ml 2. számú oldatot adunk, ennek összetétele a következő:

- 0,2 normál nátrium-hidroxid,
- 1% nátrium-lauril-szulfát.

A sejtuszuspenziót finoman, fel-le forgatva keverjük. A keveréket 10 percen át jégfürdőben inkubáljuk.

A lizált sejtuszuspenzióhoz 15 ml jéghideg 5 mólos kálium-acetát, pH= 4,8, oldatot adunk, és az elegyet fel-le forgatva keverjük. Az elegyet ezután 10 percen át jégfürdőben inkubáljuk. Az 5 mólos töménységű kálium-acetát-oldat készítésekor 11,5 ml jégecet adunk 28,5 ml vízhez, és 60 ml 5 mólos kálium-acetát-oldathoz; az így nyert oldat 3 mólos káliumra és 5 mólos acetátra nézve.

A lizált sejtuszuspenziót Beckman SW27 rotorban (vagy ennek megfelelő, más rotorban) percenkénti 20.000-es fordulatszámmal centrifugáljuk, 20 percen át, 4 °C hőmérsékleten. A sejt dezoxi-ribonukleinsavát és a sejttörmelékét a centrifugacső alján gyűjtjük össze. Az így előállított, körülbelül 36 ml térfogatú felülúszóhoz 0,6 térfogat izopropanolt adunk, az elegyet összekeverjük és 15 percen át szobahőmérsékleten hagyjuk állni. A plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 12.000 xg-n szobahőmérsékleten, 30 percen át centrifugálva gyűjtjük össze. A felülúszót kiöntjük, a dezoxi-ribonukleinsav üledéket 70%-os etanollal mossuk szobahőmérsékleten. A mosó etanolt kiöntjük, és az üledéket csökkentett nyomású térben szárítjuk. Az üledéket ezután 8 ml TE-pufferban oldjuk fel.

8 g cézium-kloridot adunk a dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz. A cézium-klorid-dezoxi-ribonukleinsav-oldat elegyének minden 10 ml-éhez 0,8 ml, 10 mg/ml koncentrációjú, vízzel készült etidium-bromidot adunk. Az elegy sűrűsége 1,55 g/ml, etidium-bromid koncentrációja pedig 600 µg/ml. Az oldatot Beckman Type 50 centrifugacsövekbe töltjük, a csöveket paraffinolajjal teljesen feltöltjük, lezárjuk, és percenként 45.000-et forduló rotorban 24 órán át 20 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A centrifugálás után közönséges fényben két dezoxi-ribonukleinsav csík látható.

A centrifugacső kupakját eltávolítjuk, majd fecskendővel, No. 21 jelű injekciós tűt használva, a centrifugacsőben levő oldatot kiszívjuk, és az alsó dezoxi-ribonukleinsav csíkot elkülönítjük. Az etidium-bromidot néhányszori vízzel telített 1-butanolos extrakcióval, a cézium-kloridot pedig TE-pufferral szemben végzett dialízissel eltávolítjuk a plazmid dezoxi-ribonukleinsavat tartalmazó oldatból. Pufferral telített fenollal, majd kloroformmal extrahálunk, ezután a dezoxi-ribonukleinsavat kicsapjuk, 70%-os etanollal mossuk és vízmentesítjük. Így 1 mg pHJL315 dezoxi-ribonukleinsavat kapunk, amit 10 ml TE-pufferban feloldunk. 5 µl TE-pufferban 5 µg pHJL315 plazmidot adunk 2 µl 10xBglII puffer (1,0 M nátrium-klorid, 100 mM trisz-hidroklorid, pH= 7,4, 100 mM magnézium-klorid, 100 mM 2-merkaptó-etanol, 1 mg/ml borjú szérum albumin), 12 µl víz és 1 µl (10 egység) BglIII restriktív enzim elegyében. az így nyert reakcióelegyet 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk.

A BglIII enzimmel emésztett pHJL315 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat ezután 1% agarózt tartalmazó gélen elektroforetizáljuk mindaddig, míg a kívánt 5,0 kb méretű BglIII restriktív fragmens világosan elkülö-

nül a többi emésztési terméktől. Az elektroforetizált dezoxi-ribonukleinsavat úgy tesszük láthatóvá, hogy a gél etidium-bromid híg oldatával (0,5 µg/ml) festjük, és a festett gél hosszúhullámú ultrabolya fényvel világítjuk meg. A kívánt fragmens helyének megállapítása után egy kis rést vágunk a fragmens elé a gélbe, és egy kis darab Schleicher és Schuell (Keene, NH 03431) NA-45 DEAE membránt helyezünk a részbe. Az elektroforezist folytatva, az 5,0 kb méretű BglIII restriktív fragmens nem kovalens módon kötődik a DEAE membránhoz.

Miután a kívánt fragmens a DEAE membránhoz kötődött, eltávolítjuk azt a gélből, és kis sókoncentrációjú pufferral mossuk. A puffer összetétele a következő:

10 mM kálium-klorid,
0,1 mM etilén-diamin-tetraecetsav,
20 mM trisz-hidro-klorid, pH= 8,0.

A dezoxi-ribonukleinsav DEAE membránról való leoldása érdekében 65 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubálunk. A 65 °C hőmérsékleten történő inkubálás után az inkubáló puffert összegyűjtjük, a membránt pedig nagy sókoncentrációjú pufferral mossuk. A mosóoldatot a kívánt dezoxi-ribonukleinsav fragmens összegyűjtése előtt egyesítjük, az inkubáláskor használt pufferral.

A dezoxi-ribonukleinsav egy sókoncentrációjú puffer-oldat térfogatát úgy állítjuk be, hogy nátrium-klorid-koncentrációja 0,25 M legyen, ezután 3 térfogat hideg, vízmentes etanolt adunk hozzá. Az így nyert elegyet összekeverjük, és 10–20 percen át -70 °C hőmérsékleten tartjuk. Az oldatot fagyaszttjuk, majd 15 percen át centrifugáljuk, percenként 15.000-et forduló rotorban. A maradék só eltávolítása érdekében végzett újabb kicsapást követően a dezoxi-ribonukleinsav üledéket etanollal mossuk, szárítjuk, végül 20 µl TE-pufferban oldjuk. Így megkapjuk a pHJL315 plazmid kívánt, 5,0 kb méretű BglIII restriktív fragmensének 1,0 µg-nyi mennyiségét. A tisztított fragmenst 2 µl TE-pufferban oldjuk, és -20 °C hőmérsékleten tároljuk.

A Streptomyces klónozó vektor pHJL401 plazmidot a 213 779 sz. európai szabadalmi leírásban írják le, erre az alábbiakban hivatkozunk. A pHJL401 plazmid előállítására szolgáló eljárást a fenti szabadalmi leírás 14. példája ismerteti.

1 µl TE-pufferban oldva 1 µg pHJL401 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 1 µl 10xBamHI puffer, 1 µl (10 egység) BamHI restriktív enzim és 7 µl víz elegyéhez. A puffer összetétele a következő:

1,5 M nátrium-klorid,
60,0 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,9,
60,0 mM magnézium-klorid,
1 mg/ml borjú szérum albumin.

Az így nyert reakcióelegyet 2 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten.

100 µl 50 mmólos trisz-hidro-klorid (pH= 8,0), valamint 1 µl 1:100 arányban a fenti pufferrel hígított borjú intesztinális alkalikus foszfatáz enzimet (Boehringer-Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Dr.,

P.O. Box 50816, Indianapolis, IN 46250) adunk a BamHI enzimmal emésztett pHJL401 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz, majd 30 percen át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet. 34 µl, BamHI enzimmal emésztett, foszfátazzal kezelt pHJL401 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk a pHJL315 plazmid 5,0 kb nagyságú BglII restrikciós fragmensének 1 µl-éhez. A dezoxi-ribonukleinsav keveréket a fentiek szerint nátrium-kloriddal és etanollal kicsapjuk, a csapadékot 10 µl, 6 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt (Boehringer-Mannheim) tartalmazó 1x ligáz-pufferban szuszpendáljuk. A puffer összetétele a következő:

- 50 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,8,
- 10 mM magnézium-klorid,
- 5 mM ditio-treitol,
- 5% glicerin,
- 0,15 mM adenozin-trifoszfát.

A ligációs reakcióelegyet 4 °C hőmérsékleten 16 órán át inkubáljuk, így a kívánt pSFH62 és a pSFH63 plazmidokhoz jutunk. A pSFH62 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 4. ábrán mutatjuk be.

A pSFH63 plazmid csupán az 5,0 kb nagyságú BglII restrikciós fragmens irányultságában különbözik a pSFH 62 plazmidtól. A ligált dezoxi-ribonukleinsavval az E. coli K12 JM109 törzs sejtjeit transzformáljuk, lényegében az alább leírt módszer szerint eljárva.

A transzformáció szempontjából kompetens E. coli K12 JM109 sejtek előállítására érdekében az ATCC törzsgyűjteményből származó, ATCC 53323 sorszámmú E. coli K12 JM109 liofilizált sejteket reaktiváljuk, majd független telepeket izolálunk. A JM109 egy független telepéből származó izolátummal oltunk 5 ml, 10 mM magnézium-szulfátot és 10 mM magnézium-kloridot tartalmazó L jelű táptalajt. Ennek összetétele a következő:

- 10 g Bacto-tripton,
- 10 g nátrium-klorid,
- 5 g Bacto-élesztő kivonat,
- 1000 ml víz.

A tenyészetet egy éjszakán át 37 °C hőmérsékleten, levegőztetett körülmények között inkubáljuk. Az inkubált tenyészet 50 µl-ével 5 ml 10 mM magnézium-szulfátot és 10 mM magnézium-kloridot tartalmazó L táptalajt oltunk. A tenyészetet egy éjszakán át 37 °C hőmérsékleten levegőztetve inkubáljuk. Másnap reggel a tenyészetet 200 ml-re hígítjuk, 10 mM magnézium-szulfátot és 10 mM magnézium-kloridot tartalmazó L-táptalajjal. A hígított tenyészetet mindaddig 37 °C hőmérsékleten levegőztetve tenyésztjük, amíg 550 nm-en (A_{550}) 0,5 abszorpciót mérünk. Ez körülbelül 1×10^8 sejt/ml sejtsűrűséget jelez. A tenyészetet 10 percen át jeges vízfürdőben hűtjük, majd 4000 g-n 10 percen át 4 °C hőmérsékleten centrifugálva összegyűjtjük a sejteket. A sejttöledéket 100 ml hideg, 10 mmólos nátrium-klorid-oldatban felszuszpendáljuk, és centrifugálással azonnal ismét kiüleptítjük. Az így nyert sejttöledéket 100 ml 30 mmólos kalcium-kloridban felszuszpendáljuk, majd 20 percen át jégfürdőben inkubáljuk. A sejteket centrifugálással újra össze-

gyűjtjük, majd 10 ml 30 mmólos kalcium-kloridban újra felszuszpendáljuk. A sejtek 1/2 ml-es alikvotját adjuk a fentiek szerint előállított, ligált dezoxi-ribonukleinsavhoz, amit előzőleg 30 mmólos kalcium-klorid-oldatban feloldunk. A sejtek és a dezoxi-ribonukleinsav elegyét 1 órán át jégfürdőben inkubáljuk, 42 °C hőmérsékleten 90 másodpercen át hősokkot alkalmazunk, majd jégfürdőben 2 percen át hűtjük a sejtsuszpenziót. A sejtek és a dezoxi-ribonukleinsav elegyét L-táptalajjal 10 ml-re hígítjuk, és egy 125 ml térfogatú lombikban 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk. A pHJL401 plazmid BamHI hasítási helye egy polilinker szakaszon található, ez a lacZ α -fragmensét kódoló dezoxi-ribonukleinsav szakasz egy részét alkotja. A lacZ α -fragmensének kifejeződése az E. coli Δ M15 vagy hasonló típusú mutánsban — mint amilyen a JM109 — helyreállítja a mutáns működőképes δ -galaktozidáz enzimet termelő képességét. Így a pHJL401 plazmid polilinker szakaszán található restrikciós hasítási helyekre történő dezoxi-ribonukleinsav ribonukleinsav-beépítés, mint amilyen a pSFH62 előállítása során játszódik le, megzavarja a lacZ α -fragmensét kódoló szekvenciát, következésképpen alkalmatlanná teszi a pHJL401 származékot a Δ M15-típusú mutáció komplementálására. A δ -galaktozidáz egy indigószinű termék keletkezése közben hidrolizálja a szintelen X-gal-t, vagyis az 5-bróm-4-klor-3-indolil- β -D-galakto-piranozidot, ezzel egy kényelmes szűrőmódszer kialakítása válik lehetőségessé a kiindulási pHJL401 plazmid, illetve a módosított plazmidok, mint például a pSKC 13, a pSFH62 vagy a pSFH63 megkülönböztetésére. A transzformációs elegy alikvotjait tehát 100 µg/ml amplicint, 40 µg/ml X-gal-t és 40 µg/ml IPTG-t tartalmazó L jelű agar táptalajokra szélesztjük. A táptalaj összetétele az L-táptalajjal azonos, azzal a különbséggel, hogy l-enként 15 g agart tartalmaz. Az IPTG a pHJL401 plazmidon található lac promoter indukálására szolgál. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáljuk. Az inszertet tartalmazó plazmidot hordozó telepek, mint például az E. coli K12 JM109/pSFH62 fehér színűek.

Néhány ampicillin-rezisztens, fehér színű telepet kiválasztunk, és ezek plazmid dezoxi-ribonukleinsavaiban restrikciós enzimes analízissel vizsgáljuk a thrB-t tartalmazó 5,0 kb méretű BglII restrikciós fragmens jelenlétét. Így módon azonosítjuk és izoláljuk a kívánt E. coli K12 JM109/pSFH62 és E. coli K12 JM109/pSFH63 transzformánsokat.

A pSKC13 plazmidot hasonló módon eljárva állítjuk elő, mint a pSFH62 és a pSFH 63 plazmidokat. A pSKC13 plazmid előállításánál azonban az 5,0 kb méretű, thrB-t tartalmazó restrikciós fragmens elkülönítése érdekében végzett BglII emésztési restrikció nem válik teljessé. Így a pMJJL315 plazmid 5,0 kb méretű BglII restrikciós fragmensével szomszédos, 0,2 kb méretű BglII restrikciós fragmenst is beépítjük az 5,0 kb méretű fragmenssel együtt a BamHI enzimmal emésztett pHJL401 plazmidba, amikor megkapjuk a pSKC13 plazmidot. A ligált dezoxi-ribonukleinsavval

lényegében a fent leírt módszer szerint eljárva transzformáljuk az *E. coli* K12 JM109 törzs sejtjeit, az *E. coli* K12 JM109/pSKC13 transzformánsokat pedig ampicillin-rezisztens fenotípusuk és plazmid dezoxi-ribonukleinsavuk restrikciós enzimekkel végzett elemzése alapján azonosítjuk. A pSKC13 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a melléklet 5. ábrán mutatjuk be.

4.példa

A pSH60, a pSFH60.1 és a pSFH61 plazmidok előállítása

A) *A pSFH60.1 és a pSFH60 plazmidok előállítása*

1 µg, 1 µl TE pufferban oldott pUC19 plazmidot (ATCC 37254) adunk 2 µl 10 x KpnI puffer, 1 µl (10 egység) KpnI restrikciós enzim és 16 µl víz elegyéhez. A 10 x puffer összetétele a következő:

- 60 mM nátrium-klorid,
- 60 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,5,
- 60 mM magnézium-klorid,
- 10 mM ditio-treitol,
- 1 mg/ml borjú szérum albumin.

Az így kapott reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk, majd a reakciót 70 °C-on, 10 percen át tartó inkubálással leállítjuk.

5 µg, 5 µl TE-pufferban oldott pSKC13 plazmidot adunk 2 µl 10 x KpnI puffer, 1 µl (10 egység) KpnI restrikciós enzim és 12 µl víz elegyéhez, majd az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk. A reakciót a reakcióelegy 70 °C hőmérsékleten 10 percen át végzett inkubálásával állítjuk le. Ezután 1%-os agaróz géltre juttatjuk az elegy egy részét, és mindaddig elektroforetizáljuk a reakcióelegyet, míg a 3,8 kb méretű, a tlrB-t tartalmazó restrikciós fragmens jól elkülönül a többi emésztési terméktől. A 3. példában leírtakkal lényegében megegyező módon eljárva, elkülönítjük a gélből és tisztítjuk a 3,8 kb méretű tlrB-t tartalmazó KpnI restrikciós fragmens 1 µg-nyi mennyiségét.

A 3,8 kb méretű, a tlrB-t gént tartalmazó KpnI restrikciós fragmens 0,5 µg-ját és a KpnI enzimmel emésztett pUC19 plazmid dezoxi-ribonukleinsav 0,1 µg-ját összekeverjük, etanollal és nátrium-klorid-oldattal kicsapjuk, majd 6 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt (Boehringer-Mannheim) tartalmazó, 10 µl térfogatú 1x ligáz-pufferban szuszpendáljuk.

A ligációs reakcióelegyet 4 °C hőmérsékleten egy éjszakán át (16 óra) inkubáljuk; tudnunk kell, hogy a ligált dezoxi-ribonukleinsav alkotja a kívánt pSFH60 és pSFH60.1 plazmidokat, ezek egymástól csupán a 3,8 kb méretű KpnI restrikciós fragmens irányultságában különböznek. A pSFH60 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 6. ábrán mutatjuk be.

A ligált dezoxi-ribonukleinsavval transzformáljuk az *E. coli* K12 JM109 törzs sejtjeit, lényegében a 3. példában leírtak szerint eljárva. A pUC19 plazmid, hasonlóan a pHJL401 plazmidhoz, a lacZ α-fragmensét kódolja, a pUC19 plazmid egyetlen KpnI hasítási helye pedig a lacZ α-fragmensét kódoló dezoxi-ribonukleinsav szakaszban található. A transzformált sejt-

teket tehát kampicillint, X-gal-t és IPTG-t tartalmazó L-agarra szélesztjük. A szintelen (fehér), ampicillinre rezisztens transzformánsok plazmid dezoxi-ribonukleinsavát restrikciós enzimekkel elemezve azonosítjuk az előállítani szándékozott *E. coli* K12 JM109/pSFH60 és az *E. coli* K12 JM109/pSFH60.1 transzformánsokat. A 3. példában megadottak szerint eljárva előállítjuk a pSFH 60 plazmidot az *E. coli* K12 JM109/pSFH60 transzformánsokból a pSFH61 plazmid előállítása céljából.

B) *A pSFH61 plazmid előállítása*

5 µg, 5 µl TE pufferban oldott pSFH60 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 2 µl alábbi összetételű 10 x HindIII puffer, 1 µl (20 egység) HindIII restrikciós enzim és 12 µl víz elegyéhez:

- 0,5 M nátrium-klorid,
- 0,5 M trisz-hidro-klorid, pH= 8,0,
- 0,1 M magnézium-klorid,
- 1,0 mg/ml borjú szérum albumin.

A reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk. A HindIII enzimmel emésztett pSFH60 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat ezután etanollal és nátrium-klorid-oldattal kicsapjuk, majd 17 µl vízhez szuszpendáljuk. 2 µl 10 x EcoRI puffert és 1 µl (20 egység) EcoRI restrikciós enzimet adunk a HindIII enzimmel emésztett pSFH60 plazmid dezoxi-ribonukleinsav oldathoz. A 10 x EcoRI puffer összetétele a következő:

- 1 M trisz-hidro-klorid, pH= 7,5,
- 0,5 M nátrium-klorid,
- 50 mM magnézium-klorid,
- 1 mg/ml borjú szérum albumin.

A kapott reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáljuk.

Az EcoRI-HindIII enzimekkel emésztett pSFH60 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat agaróz géltre juttatjuk, és mindaddig elektroforetizáljuk, míg a 3,8 kb méretű tlrB-t tartalmazó restrikciós fragmens elkülönül a többi emésztési terméktől. A 3,8 kb méretű fragmenst lényegében a 3. példában leírtak szerint eljárva különítjük el a gélből, majd tisztítjuk, amiután 1 µg fragmenshez jutunk.

1 µg pHJL401 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat emésztünk a fentiek szerint eljárva EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel. Az emésztéseket a reakcióelegy 70 °C hőmérsékleten való inkubálásával állítjuk le. Az EcoRI-HindIII enzimekkel emésztett pHJL401 plazmid dezoxi-ribonukleinsav 0,1 µg-ját, valamint a pSH60 plazmid 3,8 kb méretű, EcoRI-HindIII restrikciós fragmensének 0,5 µg-ját összekeverjük, és a dezoxi-ribonukleinsavat etanollal és nátrium-klorid-oldattal kicsapjuk. A dezoxi-ribonukleinsavat 6 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt (Boehringer-mannheim) tartalmazó, 10 µl térfogatú 1x ligáz-pufferban szuszpendáljuk, és az így nyert reakcióelegyet 4 °C hőmérsékleten egy éjszakán át (16 óra) inkubáljuk.

A ligált dezoxi-ribonukleinsav alkotja az előállítani szándékozott pSFH61 plazmidot, ezzel a plazmid dezoxi-ribonukleinsavval transzformáljuk az *E. coli* E12 JM109 törzs sejtjeit, amit a 3. példában megadottak

szerint végzünk. Az előállítandó *E. coli* K12 JM109/pSFH61 transzformánsok azonosítása érdekében az ampicillinre rezisztens, de az X-gal hidrolízisére képtelen transzformánsok plazmid dezoxi-ribonukleinsavait restrikciós enzimekkel vizsgáljuk.

A pSFH61 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 7. ábrán mutatjuk be.

5. példa

A pSVB36 és a pSVB37 plazmidok előállítása

A pSVB2 plazmid elkülönítésére lényegében az 1. példában leírtak szerint eljárva tenyésztjük, és feldolgozzuk a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB2 (NRRL 1588) törzs sejtjeit. A pSVB2 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 9. ábrán mutatjuk be. 500 ng, 5 µl TE-pufferban oldott pSVB2 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 12 µl víz, 2 µl 10x ClaI puffer és 2 µl (14 egység) ClaI restrikciós enzim elegyéhez. A 10 x ClaI puffer összetétele a következő: 0,5 M nátrium-klorid,

60 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,9,

60 mM magnézium-klorid,

1 mg/ml borjú szérum albumin.

Az előállított reakcióelegyet 30 °C hőmérsékleten egy órán át inkubáljuk. A ClaI enzimmel végzett emésztés csökkenti a nem-kívánatos ligálási termékek gyakoriságát a pSVB36 és a pSVB37 plazmidok előállítására érdekében végzett ligáláskor.

1 µl 1 mólos nátrium-klorid-oldatot és 1 µl (8 egység) BglII restrikciós enzimet adunk a ClaI enzimmel emésztett pSVB2 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz, és a reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten újabb 1 órán át inkubáljuk. Mintaként elektroforetízáljuk a reakcióelegyet 5 µl-ét, agaróz gélen, az emésztés teljességének meghatározására. 4 µl 10 x BamHI puffert, 19 µl vizet és 2 µl (4,8 egység) BamHI restrikciós enzimet adunk a BglII-ClaI enzimekkel emésztett pSVB2 plazmid dezoxi-ribonukleinsav maradék 17 µl-éhez, és a reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk.

A 10 x BamHI puffer összetétele a következő:

1,5 M nátrium-klorid,

60 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,9,

60 mM magnézium-diklorid,

1 mg/ml borjú szérum albumin.

500 ng, 5 µl TE-pufferben oldott pSVB25 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat (amit a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB25 törzs sejtjeiből lényegében az 1. példában fentebb leírtak szerint eljárva állítunk elő) adunk 11 µl víz, 2 µl 10 x BglII puffer és 2 µl (16 egység) BglII restrikciós enzim elegyéhez, és az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk. A reakcióelegyet 5 µl-ét agaróz gélen elektroforetízáljuk a BglII emésztés teljességének megállapítása érdekében, majd a BglII enzimmel emésztett pSVB25 plazmid dezoxi-ribonukleinsav maradékát etanollal kicsapjuk, és az 1. példában leírtak szerint eljárva borjú intesztinális alkalikus foszfatázzal kezeljük.

A ClaI-BglII-BamHI enzimekkel emésztett pSVB2

plazmid dezoxi-ribonukleinsav 25 µl-ét és a BglII enzimmel emésztett, alkalikus foszfatázzal kezelt pSVB25 plazmid dezoxi-ribonukleinsav 67 µl-ét összekeverjük 9,2 µl 3 mólos nátrium-acetát-oldattal és 250 µl etanollal. Az elegyet -70 °C hőmérsékleten 30 percen át fagyasztjuk, majd centrifugálással kiülepítjük a dezoxi-ribonukleinsavat. Az üledéket 10 µl, 1 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázt tartalmazó 1 x ligáz pufferban szuszpendáljuk, és az így nyert reakcióelegyet 15 °C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáljuk. A ligált dezoxi-ribonukleinsav alkotja az előállítandó pSVB36 és pSVB37 plazmidokat. A pSVB36 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 8. ábrán mutatjuk be.

A ligált dezoxi-ribonukleinsav 5 µl-ével transzformáljuk a *Streptomyces lividans* TK23 törzs sejtjeit, amit a 6. példában leírtak szerint végzünk. A kívánt *S. lividans* TK23/pSVB36 és a *Streptomyces lividans* TK23/pSVB37 transzformánsokat tilozin-rezisztens fenotípusuk alapján, valamint plazmid dezoxi-ribonukleinsavuk restrikciós enzimekkel végzett vizsgálattal azonosítjuk.

6. példa

Tilozinra rezisztens *Streptomyces lividans* TK23 transzformánsok előállítása

A) A felhasznált oldatok

Az egyértelműség kedvéért itt írjuk le azoknak az oldatoknak az összetételét, melyekre a példákban hivatkozunk.

1. P-jelű táptalaj (100 ml)

Összetevő	Mennyiség
Szacharóz	10,3 g
Kálium-szulfát	0,025 g
Nyomelem-oldat (lásd a 3. pontot)	0,2 ml
Magnézium-klorid.6H ₂ O	0,203 g
Víz	80 ml

Az autoklávban végzett sterilizálás után a következő oldatokat adagoljuk:

Kálium-dihidrogén-foszfát (0,5%)	1 ml
Kálium-klorid.2H ₂ O (3,86%)	10 ml

(N-trisz-/hidroximetil-/metil-2-amino-etán-szulfonsav)

45 TES-puffer, 0,25 M, pH=7,2 10 ml

2. L-jelű táptalaj (100 ml)

Összetevő	Mennyiség
Szacharóz (10,3%)	100 ml
TES-puffer, pH=7,2 (0,25 mól)	10 ml
Kálium-szulfát (2,5%)	1 ml
Nyomelem-oldat (lásd a 3. pontot)	0,2 ml
Kálium-dihidrogén-foszfát (0,5%)	1,0 ml
Magnézium-klorid (2,5 M)	0,1 ml
Kalcium-klorid (0,25 M)	1,0 ml
Lizozim	1 mg/ml

Az L-jelű táptalajt elkészítése után szűrve sterilizáljuk.

3. Nyomelem-oldat (1 l)

Összetevő	Mennyiség
Cink-klorid	40 mg
vas(III)-triklorid. .6H ₂ O	201 mg
réz-diklorid.2H ₂ O	10 mg
mangán-diklorid.4H ₂ O	10 mg
dinátrium-tetraborát. .10H ₂ O	10 mg
hexaammónium-molibdát. .4H ₂ O	10 ml
víz	1 l

4. R2 jelű regeneráló táptalaj (1 l)

Összetevő	Mennyiség
Szacharóz	103 g
kálium-szulfát	0,25 g
nyomelem-oldat	2 ml
magnézium-diklorid. .6H ₂ O	10,12 g
glükóz	10 g
L-aszparagin.1H ₁ O	2 g
kazminosav	0,1 g
agar	22 g
víz	700 ml-ig

Az autoklávban végzett sterilizálás után a következő oldatokat adagoljuk a táptalajhoz:

kálium-dihidrogén-foszfát (0,05 g/100 ml)	100 ml
kalcium-klorid (2,22 g/100 ml)	100 ml
TES-puffer (5,73g/ /100 ml, pH= 7,2)	100 ml
nátrium-hidroxid (5 normál)	1 ml

5. T jelű táptalaj (14,5 ml)

Összetevő	Mennyiség
szacharóz (10,3%)	2,5 ml
desztillált víz	7,5 ml
nyomelem-oldat	20 µl
kálium-szulfát (2,5%)	100 µl
kalcium-klorid (5 M)	217 µl
trisz-maleinsav, pH= = 8 (1 M)	543 µl
polietilén-glikol 1000	3,63 g

Valamennyi összetevőt a felhasználás előtt sterilizálunk. Az oldat-összetevőket összekeverjük, és ezután adjuk a megolvasztott polietilén-glikol megfelelő mennyiségéhez. Az első négy összetevőt előre is összekeverhetjük, és szobahőmérsékleten legalább egy hónapig tárolhatjuk.

6. Lágy nutrient agar (SNA, 1 l)

Összetevő	Mennyiség
Difco Bacto Nutrient táptalaj	8 g
agar	5 g

7. Az R2YE jelű táptalaj készítésekor 20 ml 25%-os élesztőkivonatot adunk az előzőekben ismertetett R2 táptalaj 1 l-éhez.

8. Élesztőkivonat-malátakivonat táptalaj (YE-ME, 1 l)

Összetevő	Mennyiség
Élesztőkivonat	3 g
pepton	5 g
malátakivonat	3 g
glükóz	10 g

9. A YEME + 34% szacharóz folyékony komplett táptalaj készítésekor 340 g/l szacharózzal egészítjük ki a YEME jelű táptalajt.

10. YMX jelű táptalaj (1 l)

Összetevő	Mennyiség
élesztőkivonat	3 g
malátakivonat	3 g
glükóz	2 g
agar	20 g

B) Protoplasztok előállítása és tárolása

A példában leírt eljárást alkalmazzuk *Streptomyces lividans* TK23 transzformánsok előállításakor és elemzésekor transzformáló DNS-ként külön-külön, egymástól függetlenül használjuk a pSVB9, pSVB25, pSVB36, pSVB37, pSFH61, pSVB47, pSFH63 és a pSKC13 plazmidokat.

30 5 mM magnézium-kloriddal és 0,5% glicinnel készített YEME + 34% szacharóz táptalajon, 30 °C hőmérsékleten, 40–48 órán át növesztjük a *Streptomyces lividans* TK23 (NRRL 15826) törzs sejtjeit. A micéliumot centrifugálással összegyűjtjük (800 xg, 10 percen át asztali centrifugában), és kétszer mossuk 10,3%-os szacharózzal. 25–50 ml tenyészetből származó sejteket 3–4 ml L jelű táptalajban szuszpendálunk, és 1 órán át 32 °C hőmérsékleten inkubáljuk a szuszpenziót. Ezután a micélium-csomók szétválasztására egyszer vagy kétszer pipettázással keverjük a szuszpenziót, ez alatt az idő alatt a micélium-csomók szétválnak. 5 ml P jelű táptalajt adunk hozzá, és a szuszpenziót egy vattadugón át szűrjük. A protoplasztokat centrifugálással összegyűjtjük (100 xg, 10 perc), és kétszer mossuk 5 ml P jelű táptalajjal.

45 Ezután 4 ml P táptalajban szuszpendáljuk a protoplasztokat, és a protoplasztok számát hemocitóméter tárgylemez segítségével mikroszkóppal meghatározzuk. Ha nem azonnal kívánjuk őket felhasználni, akkor a szuszpenzió 5×10^9 – 10^{10} protoplasztot tartalmazó alikvotjait (körülbelül 1 ml) steril csavaros tetejű polipropilén csövekbe osztjuk szét. A szuszpenziókat lassan lefagyasztjuk: a csöveket jéggel töltött tárolóedénybe tesszük, majd a tárolóedényt -70 °C hőmérsékletre helyezzük. Felhasználásig ezen a hőmérsékleten tároljuk a protoplasztokat. Felhasználás előtt a fagyasztott szuszpenziót 37 °C-os vízfürdőbe merítve, gyorsan felmelegítjük.

C) A protoplasztok transzformációja

55 5×10^9 protoplasztot centrifugálással (800 xg, 10

perc) kiülepítünk. A felülúszót kiöntjük, és a protoplasztokat a csőben maradó kismennyiségű folyadékban felszuszpendáljuk. Nem több, mint 20 µl TE pufferban oldott plazmid dezoxi-ribonukleinsavat, majd azonnal 0,5 ml T jelű táptalajt adunk a szuszpenzióhoz. Az elegyet pipettázással egyszer összekeverjük. Ezután a protoplaszt szuszpenziót vagy közvetlenül agaros táptalajra juttatjuk, vagy 0,5 ml P táptalajjal hígítjuk, és ezután juttatjuk agart tartalmazó táptalaj felületére. Lemezenként mindkét esetben 0,1 ml szuszpenziót szélesztünk az R2Y" jelű táptalaj felületén.

A tilozinra rezisztens transzformánsokat úgy választjuk ki, hogy a regenerált portoplasztokat 500 µg/ml tilozint tartalmazó R2YE táptalajra replikázzuk. Alternatív módon úgy is eljárhatunk, hogy a tilozin-rezisztens transzformánsok kiválasztására a regenerálódó protoplasztokat tilozint tartalmazó, lágy nutrient tápaggal felülrétegezzük. A regeneráló lemezeket 16–22 órán át 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk, mielőtt lemezenként 2,5 ml (45–50 °C hőmérsékletű) olyan SNA táptalajjal rétegeznénk, amely elegendő tilozint tartalmaz ahhoz, hogy a diffúzió után 500 µg/ml végkoncentráció alakuljon ki. A pIJ702 származékokat hordozó transzformánsok malein-termelését vagy ennek hiányát az SNA fedő rétegbe 750 µg/ml tirozint keverve mutatjuk ki. Az ép tirozináz gént hordozó transzformánsok tirozin jelenlétében növekedve fekete színűek.

D) *A Streptomyces lividans transzformánsok vizsgálata*

A transzformánsokat tilozinnal (500 µg/ml) kiegészített R2YE agar táptalajon tenyésztjük, azért, hogy különálló telepeket kapjunk. Ezekkel a különálló telepekkel 20 µg/ml tiosztrepont is tartalmazó, 10 ml térfogatú TSB táptalajokat oltunk. A tenyészeteket homogenizáljuk, majd egy éjszakán át 30 °C hőmérsékleten kör mentén mozgó rázógépen tenyésztjük.

A vizsgálandó plazmidok elkülönítését az 1. példában leírt eljárás egy kisebb térfogatokra vonatkozó változata szerint végezzük. Az 1. példa szerinti céziüm-klorid gradiens centrifugálást etanolos kicsapásokkal helyettesítjük. A micéliumot centrifugálással összegyűjtjük, 10,3%-os szacharóz-oldattal kétszer mossuk, majd 1–2 ml 10,3%-os szacharóz-oldattal felszuszpendáljuk. A sejtsuszpenzió 400 µl-ét kis csőbe töltjük, és 100 µl 5x lizozim-oldatot (lásd az 1. példában) adunk hozzá. A szuszpenziót 30 °C hőmérsékleten, 30–60 percen át inkubáljuk, majd 300 µl 1% nátrium-lauril-szulfátot tartalmazó, 0,3 mólos nátrium-hidroxid-oldatot adunk hozzá, és összekeverjük. Ez utóbbi oldatot 50 °C hőmérsékleten tartjuk, mielőtt a sejtsuszpenzióhoz adnánk. 10 percen 80 °C hőmérsékletre helyezzük az elegyet, szobahőmérsékletre hűtjük, majd fenol és kloroform 50:50 arányú elegyének 200 µl-ével extraháljuk. A vizes fázist egy tiszta csőbe töltjük, 0,3 M végkoncentrációig nátrium-acetátot, majd 1 térfogat izopropanolt adunk hozzá. 5 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk a dezoxi-ribonukleinsavat, ezután centrifugálással kicsapjuk. Az

üledéket 400 µl TE-pufferban oldjuk, és nátrium-acetát-oldatot adunk hozzá úgy, hogy annak végkoncentrációja 0,3 M legyen.

2,5 térfogat etanol hozzáadása után az elegyet – 70 °C hőmérsékleten 30 percen át inkubáljuk. Centrifugálás és újabb kicsapás után a plazmid dezoxi-ribonukleinsavat 50 µl TE pufferban oldjuk fel. A plazmid szerkezetének meghatározására restrikciós enzimekkel hasítást, és a reakciótermékek elektroforézisével analízist végzünk.

7. példa

A pSVB47 plazmid előállítás

A) *A pSVB40 plazmid előállítása*

1,2 µg, 4 µl TE-pufferban oldott pUC19 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 2 µl 10 x SacI puffer, 1 µl (10 egység) SacI restrikciós enzim és 13 µl víz elegyéhez. A puffer összetétele a következő:

60 mM trisz-hidro-klorid, pH= 7,4,
60 mM magnézium-klorid,
60 mM 2-merkapto-etanol,
100 mg/ml borjú szérum albumin.

A reakcióelegyet 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. 6 µl 10 x BglII puffert, 2 µl (20 egység) BglII restrikciós enzimet és 32 µl vizet adunk az SacI enzimmel emésztett pUC19 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-oldatához, és az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten tároljuk további 1 órán át.

1 µg, 10 µl TE-pufferben oldott pSVB25 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 2 µl 10 x SacI puffer, 1 µl (10 egység) SacI restrikciós enzim és 7 µl víz elegyéhez, majd az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk. 6 µl 10 x BglII puffert, 2 µl (20 egység) BglII restrikciós enzimet és 31 µl vizet adunk a SacI enzimmel emésztett pSVB25 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz, és a reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk.

150 ng (7,5 µl) SacI-BglII enzimekkel emésztett pUC19 plazmidot és 375 ng (22 µl) SacI-BglII enzimekkel emésztett pSVB25 plazmidot összekeverünk, és nátrium-klorid-oldattal, valamint etanollal kicsapjuk. A dezoxi-ribonukleinsavat 5 µl, 3 egység T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázt (Boehringer-Mannheim) tartozó 1 x ligáz pufferban szuszpendáljuk, és az így nyert reakcióelegyet 4 °C hőmérsékleten 16 órán át inkubáljuk. A ligált DNS azonos az előállítani szándékozott pSVB40 plazmiddal. A pSVB40 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 11. ábrán mutatjuk be.

A ligált dezoxi-ribonukleinsavval a 3. példában leírtak szerint eljárva transzformáljuk az E. coli D12 JM109 törzs sejtjeit. A transzformált sejteteket 40 µg/ml IPTG-t, 40 µg/ml X-gal-t és 100 µg/ml ampicillint tartalmazó L jelű agar-lemezekre szélesztjük. A nem sötétszínű telepek dezoxi-ribonukleinsavát restrikciós enzimekkel elemezzük, a kívánt E coli K12 JM109/pSVVB40 transzformánsok azonosítása érdekében. A pSVB47 plazmid előállításához használt plazmid dezoxi-ribonukleinsavat lényegében a 3. példában leírtak szerint eljárva, az E. coli K12 JM109/pSVB40 transzformánsokból állítjuk elő.

B) A pSVB47 plazmid előállítás

1,2 µg, 1,4 µl TE-pufferban oldott pIJ903 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 2 µl 10xHindIII puffer, 1 µl (10 egység) HindIII restriktív enzim és 13 µl víz elegyéhez. Az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 1 órán át.

6 µl 10 x EcoRI puffert, 2 µl (20 egység) EcoRI restriktív enzimet és 32 µl vizet adunk a HindIII enzimmal emésztett pIJ903 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz, és a reakcióelegyet további 1 órán át 37 °C hőmérsékleten tároljuk.

1 µg, 10 µl TE-pufferben oldott pSVB40 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat adunk 2 µl 10 x HindIII puffer, 1 µl (10 egység) HindIII restriktív enzim és 7 µl víz elegyéhez, majd a reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk. 6 µl 10 x EcoRI puffert, 2 µl (20 egység) EcoRI restriktív enzimet és 32 µl vizet adunk a HindIII enzimmal emésztett pSVB40 plazmid dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz, majd a reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk.

150 ng (7,5 µl) HindIII-EcoRI enzimekkel emésztett pIJ903 plazmidot és 375 ng (22 µl) HindIII-EcoRI enzimekkel emésztett pSVB40 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat összekeverünk, és nátrium-kloriddal, valamint etanollal kicsapjuk. A dezoxi-ribonukleinsavat 5 µl, 3 egység T4 ligáz (Boehringer-Mannheim) tartalmazó 1x ligáz pufferben szuszpendáljuk fel. A ligált dezoxi-ribonukleinsav alkotja az előállítani kívánt pSVB47 plazmidot. A pSVB47 plazmid restriktív és funkcionális térképét a 12. ábrán mutatjuk be.

A ligált dezoxi-ribonukleinsavval a 6. példában megadottak szerint eljárva transzformáljuk a *Streptomyces lividans* törzs sejtjeit.

SZABADALMIIGÉNYPONT

1. Eljárás rekombináns, tilozin rezisztenciát meghatározó klónozó dezoxi-ribonukleinsav vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a *Streptomyces fradiae* thrB génjét, valamint egy *Streptomyces* replikációs origót hordozó dezoxi-ribonukleinsav szakaszt ligálunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vektorként plazmidot használunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vektorként plazmidot használunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pSVB9 plazmid 3,35 kb nagyságú BglII-SacI restriktív fragmensét, vagy a pHJL315 plazmid 5,0 kb nagyságú BglII restriktív fragmensét ligáljuk a *Streptomyces* replikációs origót hordozó dezoxi-ribonukleinsav szakasszal.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a *Streptomyces* replikációs origót tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav szakasz a pIJ702, a pIJ903 vagy a pHJL401 plazmid restriktív fragmense.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSVB25 plazmid

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pIJ702 plazmid BglII-SacI restriktív fragmensét BglII-SacI-ClaI enzimekkel emésztett pSVB9 plazmiddal ligáljuk.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSFH62 és a pSFH63 plazmidok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pHJL315 plazmid 5,0 kb nagyságú BglII restriktív fragmensét BamHI enzimmal emésztett pHJL401 plazmiddal ligáljuk.

7. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSKC13 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pHJL315 plazmid 5,2 kb nagyságú BglII restriktív fragmensét BamHI enzimmal emésztett pHJL401 plazmiddal ligáljuk.

8. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSH60 és a pSFH60.1 plazmidok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pSKC13 plazmid 3,8 kb méretű KpnI restriktív fragmensét KpnI enzimmal emésztett pUC19 plazmiddal ligáljuk.

9. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSFH61 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pSFH60 plazmid 3,8 kb méretű EcoRI-HindIII restriktív fragmensét EcoRI-HindIII enzimekkel emésztett pHJL401 plazmiddal ligáljuk.

10. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSVB36 és a pSVB37 plazmidok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a psvB2 plazmid 2,86 kb nagyságú BamHI-BglII restriktív fragmensét BglII enzimmal emésztett pSVB25 plazmiddal ligáljuk.

11. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSVB40 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pSVB2 plazmid 3,35 kb méretű SaI-BglII restriktív fragmensét SacI-BglII enzimekkel emésztett pUC19 plazmiddal ligáljuk.

12. A 4. igénypont szerinti eljárás a pSVB47 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a pSVB40 plazmid 3,8 kb méretű EcoRI-HindIII restriktív fragmensét EcoRI-HindIII enzimekkel emésztett IJ903 plazmiddal ligáljuk.

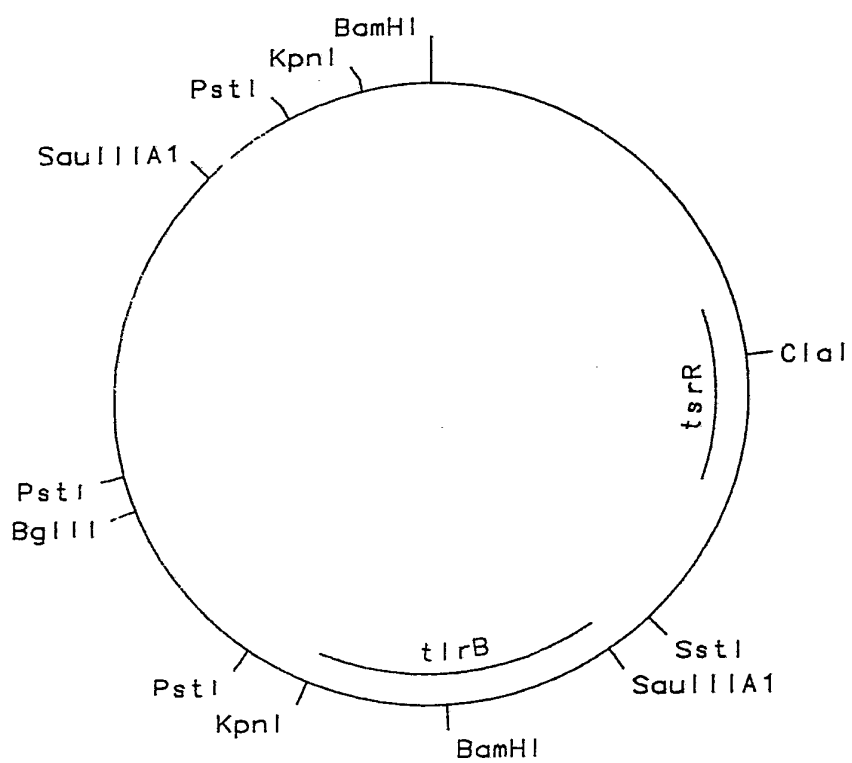
13. Eljárás *Streptomyces* gazdasejtek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1–12. igénypontok bármelyike szerint előállított vektor dezoxi-ribonukleinsavat *Streptomyces* protoplasztok szuszpenziójához adjuk a protoplasztokat regeneráljuk, és a regenerálódó, vagy már regenerált transzformált sejteket tilozin rezisztenciára szelektáljuk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vektor dezoxi-ribonukleinsavat *Streptomyces lividans* protoplasztok szuszpenziójához adjuk.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a regenerált protoplasztokat tilozint tartalmazó regeneráló táptalajra replikázzuk, és így szelektáljuk a tilozin rezisztens transzformánsokat.

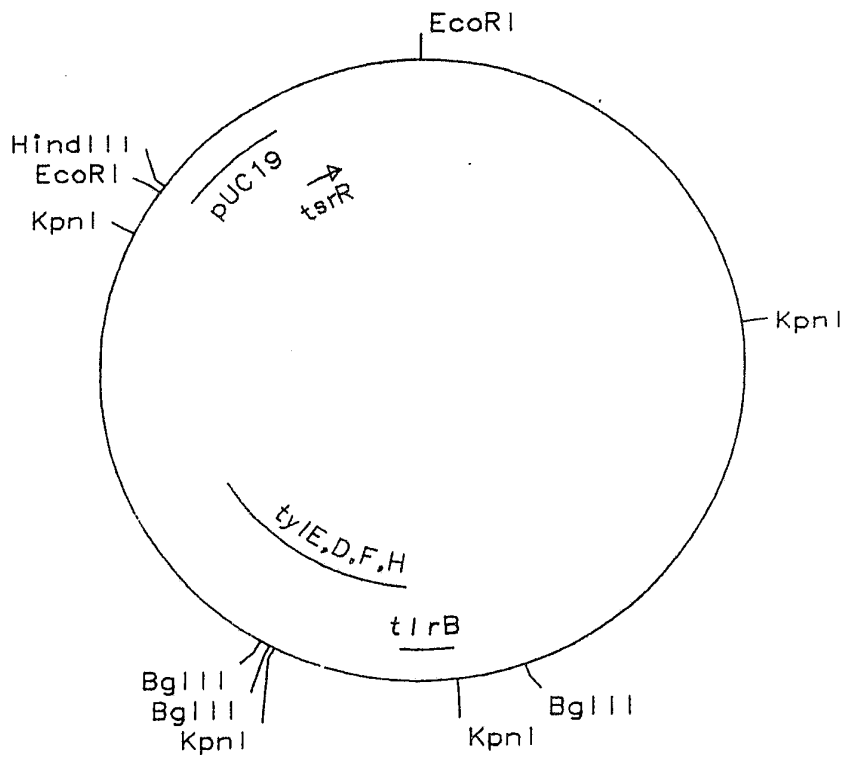
16. A 13. vagy 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tilozin rezisztens transzformánsok szelektálására a regenerálódó protoplasztokat tilozint tartalmazó komplett tenyésztő táptalajjal felülrétegezzük.

1. ábra



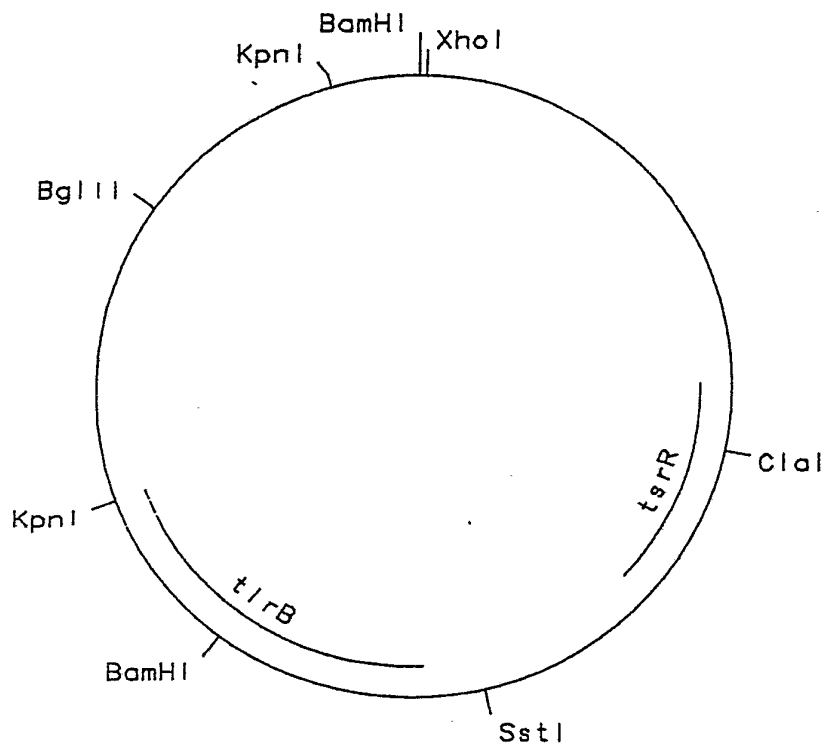
A pSVB9 plazmid(10, 7 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

2. ábra



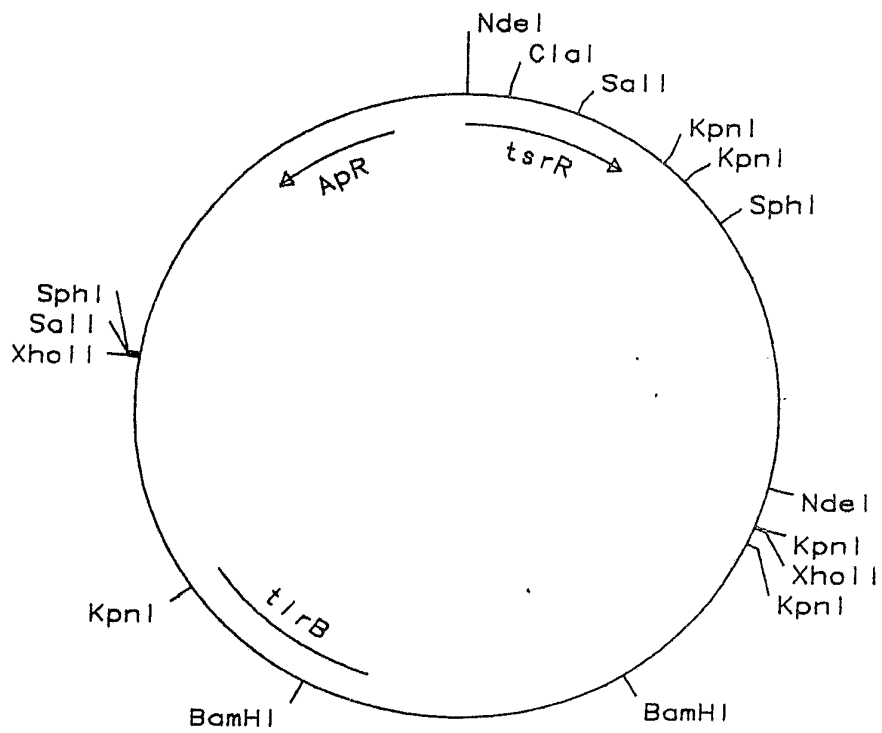
A pHJL315 plazmid (38,8 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

3. ábra



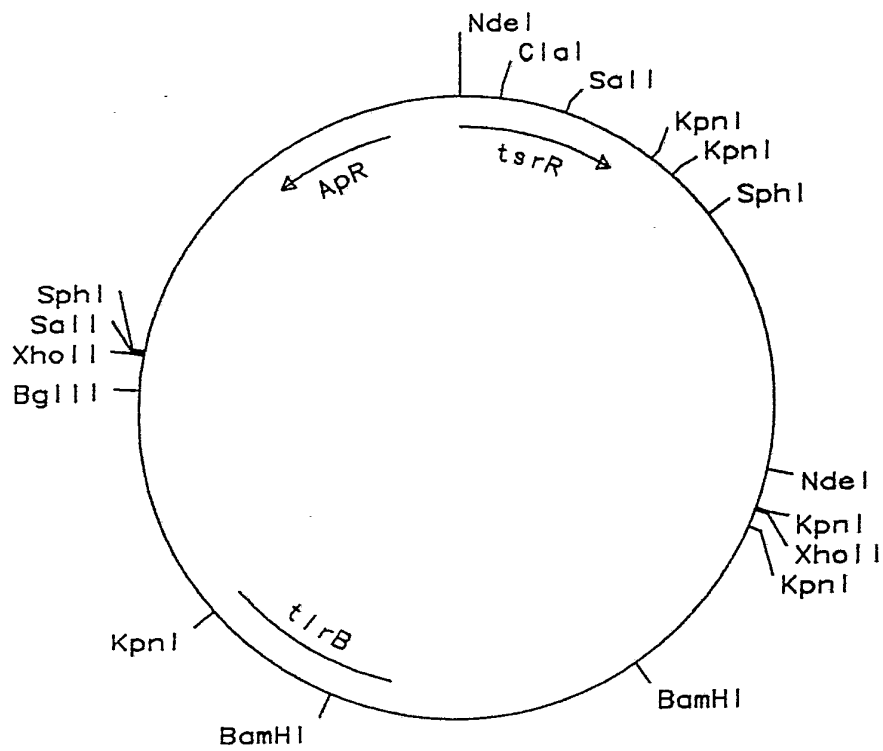
A pSVB25 plazmid (8,7 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

4. ábra



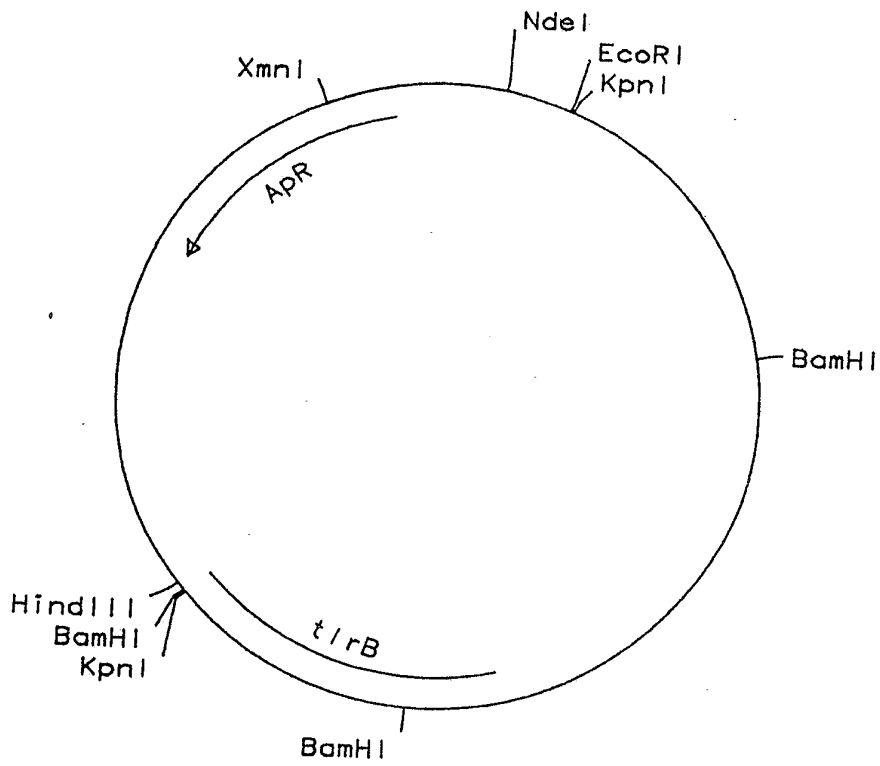
A pSFH62 plazmid (10,9 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

5. ábra



A pSKC13 plazmid (11,1 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

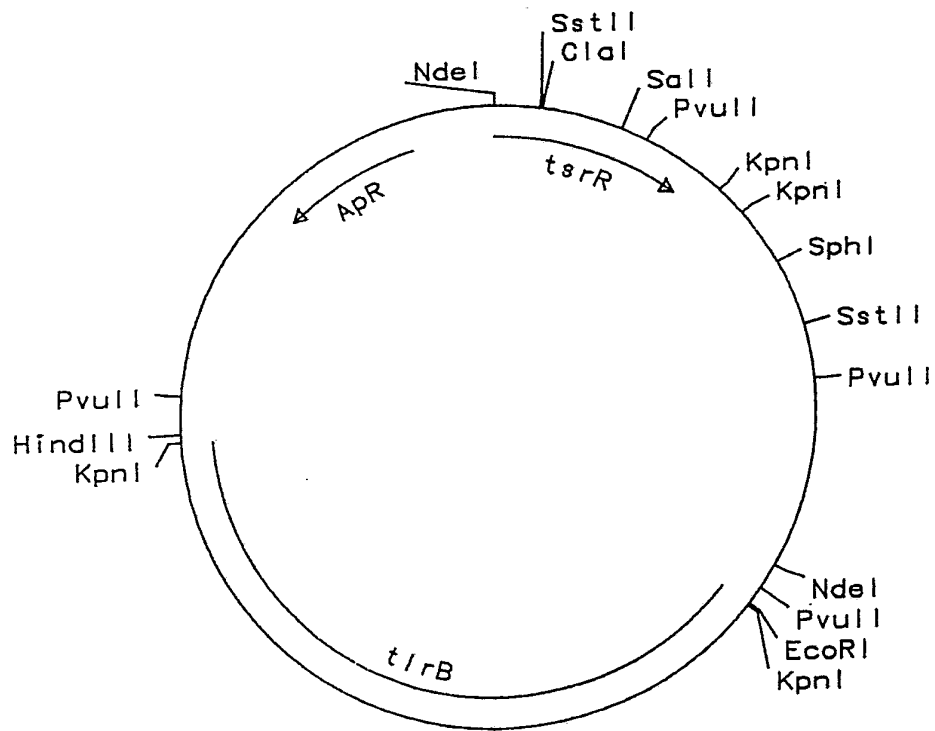
6. ábra



A pSFH60 plazmid (6,3 kb) restrikciós és

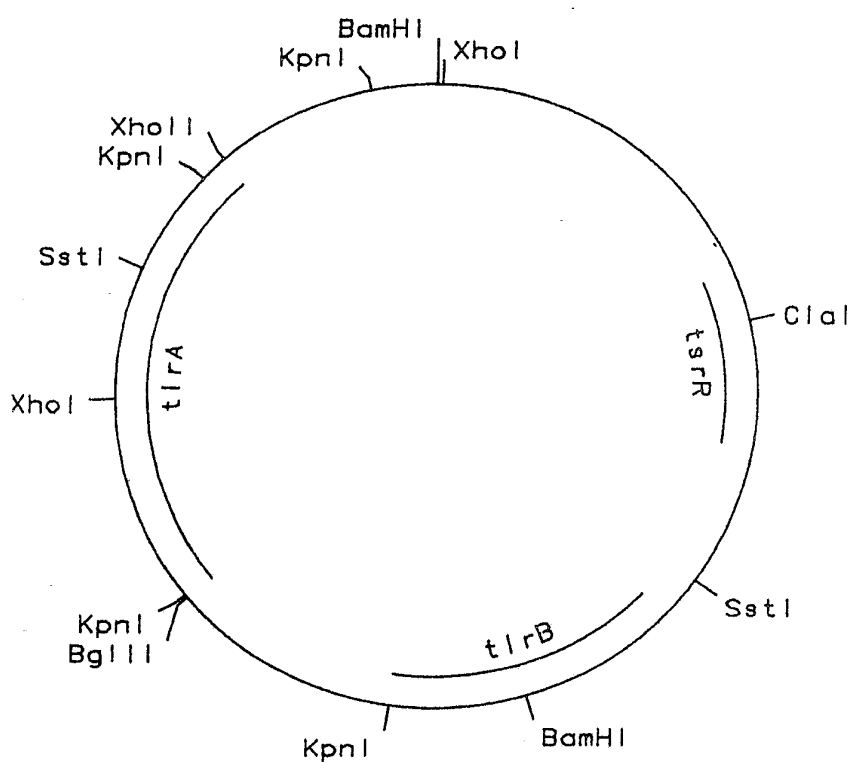
funkcionális térképe

7. ábra



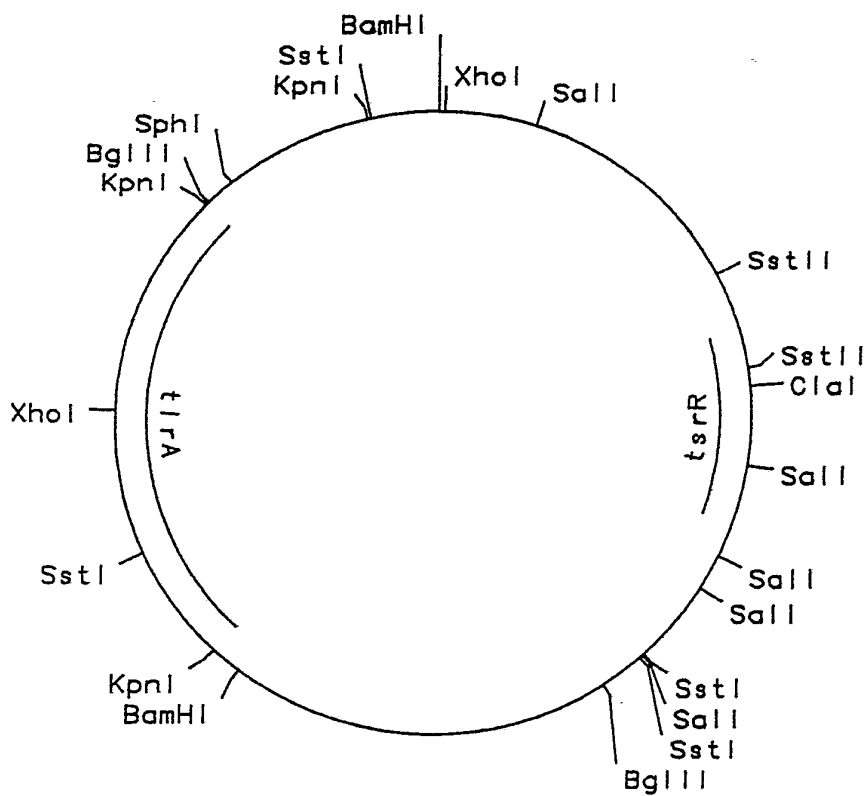
A pSFH61 plazmid (9,4 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

8. ábra



A pSVB36 plazmid (11, 6 kb) restrikcios és
funkcionális térképe

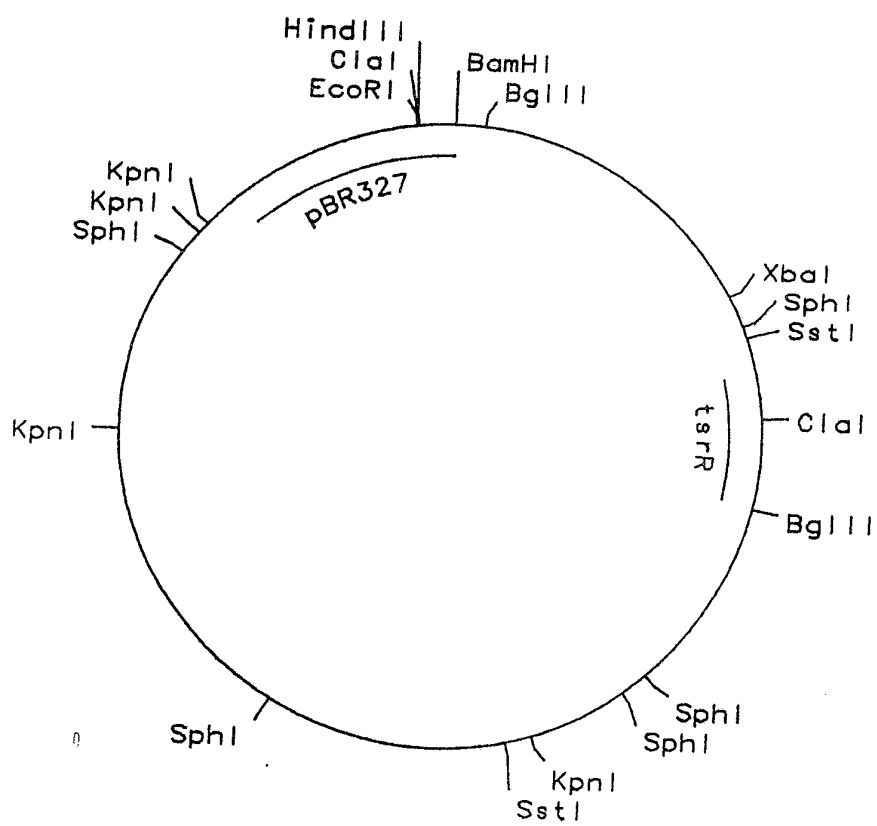
9. ábra



A pSVB2 plazmid (10, 55 kb) restrikcios és

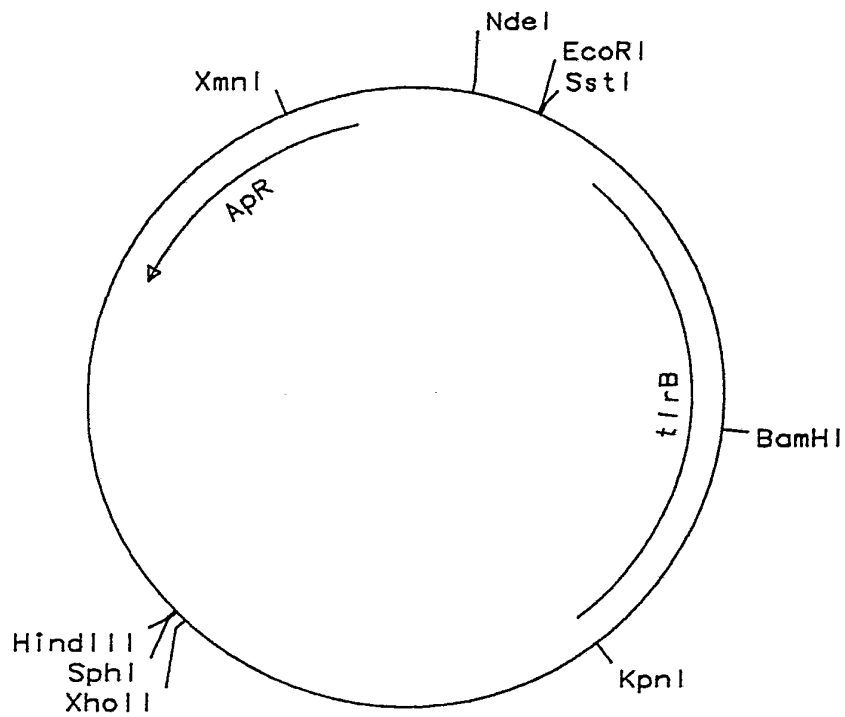
funkcionális térképe

10. ábra



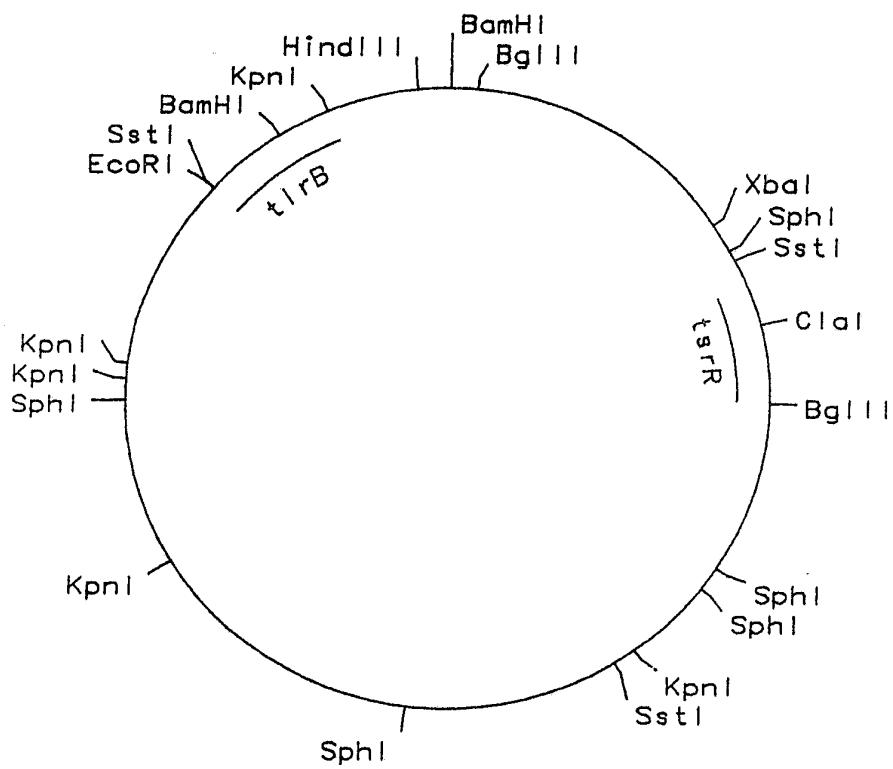
A pIJ903 plazmid (25, 8 kb) restrikcios és
funkcionális térképe

II. ábra



A pSVB40 plazmid (6,0 kb) restrikciós és
funkcionális térképe

12. ábra



A pSVB47 plazmid (29,15 kb) restrikciós és
funkcionális térképe