

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201350 B

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/68

(22) Bejelentés napja: 1983.09.15. (21) 3766/83

(30) Bejelentés elsőbbsége:

(4151/82) 1982.09.16.

(4270/82) 1982.09.24.

(4107/83) 1983.09.09. DK

(86) Nemzetközi bejelentési szám:

PCT/DK83/00086

(87) Nemzetközi közzétételi szám:

WO84/01172

(40) Közzététel napja: 1984.09.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.10.28.

(72) Feltalálók:

MOLIN Soren,

GERDES Kenn, Odense, (DK)

(73) Szabadalmas:

A/S Alfred Benzon,

Koppenhága, (DK)

(54) ELJÁRÁS PLAZMIDOK STABILIZÁLÁSÁRA

(57) KIVONAT

Azokat a plazmidokat, amelyek önmagukban nem stabilan öröklődnek, vagy amelyek egy vagy több, a plazmiddal természet szerint nem rokon gént tartalmazó DNS fragmens beiktatása miatt nem-stabillá váltak, stabilizálják egy par terület, elősorban egy R1 plazmid par terület által kifejtett megosztási funkció segítségével, amely par területet egy DNS fragmensben iktatnak be a plazmidba; ez a DNS fragmens lehet azonos hosszúságú a vad típusú R1 EcoR1-A fragmenssel, de előnyösen rövidebb annál, és ez tartalmazhatja az R1 par A területet, az R1 par B területet, vagy mindkét R1 par területet. A több különböző típusú plazmidnál nyert stabilizálás, különösen mindkét R1 par terület alkalmazása esetén, megközelíti a vad típusú plazmidok stabilizálási szintjét, vagyis ezek elveszési gyakorisága általában kisebb, mint $5 \cdot 10^{-6}$ /sejt/generáció.

Az ilyen stabilizált plazmidok használhatóak a gén-termékek nagy mennyiségű termelésénél; és nem szükségesek sajátos baktérium-törzsek vagy mutánsok, hogy biztosítva legyen a plazmid fenntartása; ugyancsak szükségtelen speciális összetételű tápközegek alkalmazása, amelyekben a gazdasejtnek növekednie kellene, hogy a plazmid elveszését megelőzzék a baktérium-populációból.

A leírás terjedelme: 17 oldal, 5 rajz, 18 ábra

HU 201350 B

A találmány tárgya eljárás a gének és termékeik előállításához alkalmazott rekombináns DNS technológia területén használatos plazmidok stabilizálására.

A legtöbb természetes plazmid folyamatos fenntartása, még szelekciós kényszer hiányában is (azaz olyan tényezők hiányában, amelyek csak azoknak az organizmusoknak a növekedését teszik lehetővé, amelyek magukba foglalják a plazmidot; erre példa egy antibiotikum a tápközegben olyan plazmid esetében, amely az illető antibiotikum-rezisztenciát közvetítő gént hordozza) azt sugallja, hogy a plazmid-fenntartási funkciók úgy fejlődtek ki, hogy biztosítsák ezeknek az extrakromoszómális elemeknek a folyamatos jelenlétét nagy hatékonysággal. A plazmid-fenntartási funkciók elsődlegesen a gének replikációjából állnak, beleértve ezek szabályozó köreit is, amelyek szabályozzák a plazmid koncentrációját a sejtben. A növekvő sejtekben a replikációs szabályozó rendszer a plazmid-kópiák számától függően a plazmid-replikáció valószínűségének növelésével vagy csökkentésével helyreállítja az átlagtól való eltéréseket. Nincs azonban olyan szabályozó rendszer, amely meg tudná akadályozni olyan sejtek előfordulását, amelyekben nagyon kevés vagy éppen csak egy plazmid van, és nyilvánvaló, hogy ilyen sejtekből vagy lehetőség arra is, hogy plazmidmentes leánysejt képződjék. Ez a probléma természetesen a kis kópiaszámú plazmidoknál a legnagyobb. Sőt, a plazmidmolekulák passzív eloszlása a sejtosztódásnál szükségszerűen eredményez bizonyos gyakorisággal plazmidmentes sejteket. Mivel a plazmidmolekula elvesztése a sejtől irreverzibilis, egy ilyen nem-stabil szituáció következménye az lesz, hogy a teljes populáció végül is plazmidmentessé válik.

A plazmidok sejtosztódásnál történő véletlenszerű eloszlása mellett más tényezők is befolyásolhatják a plazmidok elvesztésének arányát a plazmid fenntartásához szolgáló, szelekció hiányában nőtt sejtek tenyészetéből. Így pl. néhány plazmid speciális rekombinációs rendszert igényel abból a célból, hogy a két újonnan replikált molekula szétváljon (Austin és munkatársai, Cell, 25, 1981, 729-36 oldal). A szétválás hiányában multimer képződnek (egymásba kapcsolnak), és ilyen módon a leánysejteké osztódás szintjén még egy nagy kópiaszámú plazmid is úgy tűnhet, mint egy kis kópiaszámú plazmid, mivel a plazmidmentes sejtek keletkezésének valószínűsége növekszik a multimer szerkezetben egymásba kapcsolt plazmidmolekulák számának növekedésével. Egy másik jelenség, amelyet gyakran meg lehet figyelni a rekombináns DNS technológiában, egy stabil klónozó vektor átalakulása nem-stabil hibrid vektorrá, egy DNS fragmens beiktatásának eredményeképpen, amelynek jelenléte vagy csökkenést okoz a plazmid kópiaszámában, vagy

egy sérült terméket szolgáltat, amely negatív hat a sejt növekedésre.

Minden ilyen esetben a plazmid kiválása és elvesztése egy bizonyos (kisebb vagy nagyobb) gyakorisággal történik, amelyet nem könnyű kívülről befolyásolni.

A természetes plazmidok stabilitása, különösen a kis kópiaszámú plazmidoké, azt sugallja, hogy a replikációs szabályozó rendszeren kívül a fenntartási funkciók egy második sorozata is létezik, amely aktívan részt vesz a plazmidmolekulák rendezett elosztásában a sejtosztódásnál. Az ilyen funkciókat megosztási funkcióknak nevezzük, és tanulmányok (pl. Meacock és munkatársai: Cell 20, 1980, 529-42 oldal; Nordström és munkatársai: Plasmid, 4, 1980, 332-49 oldal, Seelke és munkatársai: Plasmid, 7, 1982, 163-79 oldal) már rámutattak, hogy ezeket legalábbis részben maguk a plazmidok kódolják (.par' területekben). Így bizonyos plazmid-hiányos mutánsok elvesztették stabil fenntarthatóságukat vagy öröklődésüket annak ellenére, hogy normál vad típusú viselkedést mutatnak, jelezve, hogy egy plazmid-fajlagos funkció, amely a stabilitást biztosítja, kiiktatódott (lásd Nordström és munkatársai fentebb idézett munkáját).

Mivel sok a rekombináns DNS technológiában vektorként alkalmazott plazmid nagy mennyiségű DNS-t veszít a vad típusú szülő-plazmidokhoz viszonyítva, ezek hajlamosak a nem-stabil öröklődésre. Ez komoly problémát vet fel, mivel a plazmid instabilitása végül is a plazmid teljes elvesztését eredményezi a sejtekből, ami csökkenti a plazmiddal kódolt géntermékek relatív kitermelését. Ez a probléma különösen jelentős a géntermékek nagy mennyiségű termelésénél, ahol a mikroorganizmusok növekedése szelekciós kényszer, pl. egy antibiotikum, mellett nem vihető keresztül, de gyakran környezeti szempontokból legalábbis nem kívánatos, és ahol a mikroorganizmusok generációk nagy számán keresztül növekednek. Az olyan vektorok, amelyek sejtenként csak néhány kópiában vannak jelen, a legvalószínűbb, hogy nem stabilan öröklődnek és ezért eltűnnek a sejtől. Még azokról a plazmidokról is ismeretes, amelyek szokásosan viszonylag nagy kópiaszámúak a plazmidnak viszonylag jó stabilitást biztosítva, hogy nem-stabillá válnak, amikor a plazmiddal természet szerint nem rokon gént hordozó DNS fragmenseket iktatnak beléjük.

A jelen találmány tárgyát olyan plazmidok képezik, amelyek a plazmiddal természet szerint nem rokon beiktatott gént vagy géneket hordoznak, és amelyek ezen túl egy olyan beiktatott gént is hordoznak, amely megosztási funkciókat lát el. A 'beiktatott' kifejezés azt jelenti, hogy a gén(ek)et vagy DNS fragmenst a végső plazmid kialakítása valamely szakaszában vezetjük be a plazmidba.

A leírásban a „megosztási funkció” olyan funkciót jelent, amely a plazmidmolekulák rendezett elosztását biztosítja sejtosztódásnál, és amelyet a plazmidnak egy olyan területe kódol, amely - a funkciót kifejező plazmid típusától függően - egy vagy több génből áll. Amint korábban említettük, ilyen területeket találtak a természetben előforduló vagy vad típusú plazmidokban; de az olyan plazmidok, amelyek egy Par⁺ fenotípust fejeznek ki, vagyis amelyekben a megosztó gén jelen van, és ugyanakkor a plazmidokkal természet szerint nem rokon beiktatott gént vagy géneket is hordoznak, újnak tekinthetők. Ebben a szövegben a plazmidokat úgy határozzuk meg, mint természetben előforduló extrakromoszomális elemeket a mikroorganizmusokban, amely elemeket önmagukban vagy származékaikként izolálni lehet.

A találmány szerinti plazmidok a rekombinációs DNS technológia területén klónozó vagy termelő vektorként alkalmazhatók abból a célból, hogy technikai vagy orvosi célú termékek széles választékát nyerjük, amelyek előállítását közvetve vagy közvetlenül a beiktatott gén vagy gének közvetítik, ilyen termékek elsősorban a polipeptidek, peptidok vagy ezek fragmenszei, enzimek, az enzimek reakcióinak nagy számú nem-fehérjeszerű termékei, olyan kis molekulatömegű termékek, mint hormonok és nukleinsavak; különösen jelentősek az eukarióta, elsősorban az emlős gének termékei.

A találmány szerinti eljárás előnyös megvalósítási módja értelmében a megosztási funkció egy olyan funkció, amelyet a természetben R₁ vad típusú rezisztencia plazmid területe fejez ki, és ezért a továbbiakban ezt R₁ par területnek fogjuk nevezni. A jelen találmány szerint egy ilyen területről azt találtuk, hogy részleges vagy teljes stabilitást idéz elő nemcsak a plazmiddal természet szerint nem rokon gént vagy géneket hordozó nem-stabil R₁ miniplazmidoknál, hanem a plazmiddal természet szerint nem rokon gént vagy géneket hordozó, R₁ plazmiddal nem rokon, gyakran kiválasztódó plazmidoknál is. Egy másik példa a különösen értékes megosztási funkcióra az, amelyet a vad típusú F plazmidra találtak (Seelke és munkatársai, fentebb idézett munka), amely szintén nagy mértékű stabilitást ad a befogadó plazmidnak. A következőkben elsősorban az R₁ Par funkcióra hivatkozunk, de belátható, hogy a legtöbb jelenség, amely az R₁ Par funkcióval kapcsolatos, más Par funkciókra is érvényes, és hogy a találmány nem korlátozódik csupán az R₁ Par funkcióra.

Azt már korábban jelezték, hogy az R₁ plazmid megosztási funkcióját az úgynevezett EcoR₁-A fragmens fejti ki (Nordström és munkatársai, Plasmid, 4, 1980, 332-49 oldal). A jelen találmányhoz vezető kutatás folyamán meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy az EcoR₁-A fragmens, amely Kb. 19 kb (19000 bá-

zispár) hosszúságú, két és csak két elhatárolható területet tartalmaz, amely Par⁺ fenotípust ad a befogadó plazmidnak. Ezek a területek az EcoR₁-A fragmens egyik végén helyezkednek el, és nincs olyan más DNS szekvencia az EcoR₁-A fragmensben, amelyről jelenleg úgy hinnénk, hogy bármiféle plazmidstabilizáló funkciója van. A jelen célokra a két területet par A és par B területnek nevezzük, és a későbbiekben rövidítve csak par A-nak és par B-nek jelöljük.

Előnyös olyan kis DNS fragmensekkel dolgozni, amilyen kicsikkel csak lehetséges, mivel a kis fragmensek beiktatása könnyebb a plazmidba, és az így kialakult plazmidot is könnyebb transzformálni a gazdasejtbe; ezért a jelen találmány egyik tárgya eljárás olyan plazmid előállítására, amely olyan beiktatott DNS fragmenst hordoz, amely rövidebb, mint az R₁ plazmid EcoR₁ fragmense, és tartalmazza az R₁ par területet. Ez a beiktatott DNS fragmens normálisan főkomponensként tartalmazza az R₁ par terület A területét, vagy az R₁ par terület B területét, vagy mind az R₁ par terület A, mind az R₁ par terület B területét. Ez azt jelenti, hogy lényegileg mindegyik, a gazdaplazmidba beiktatott DNS fragmens vagy egyik, vagy mindkét par területből van kialakítva, és a fragmenseken levő többi DNS elsősorban azért van jelen, hogy megfelelő restrikciós helyeket szolgáltatson, és olyan DNS fragmensek alakuljanak ki, amelyek a megkívánt végekkel rendelkeznek, amely végek könnyen összeférhetők a befogadó plazmidon levő megfelelő vagy összeférhető restrikciós helyekkel. Ilyen végeket kapcsolók segítségével is ki lehet alakítani. A par A területet tartalmazó DNS fragmenst és a par B területet tartalmazó DNS fragmenst lehet külön-külön, egymás után is bevezetni ugyanabba a plazmidba, amely azután fenotípusosan azonos lesz egy olyan plazmiddal, amelyben a Par A⁺, Par B⁺ fenotípus az ugyanabban a DNS fragmensben levő par A terület és par B terület beiktatásával alakult ki. Így pl. ha egy olyan plazmidot kívánunk tovább stabilizálni, amely már hordoz egy par területet, pl. a par B területet, a plazmidot el lehet hasítani egy megfelelő restrikciós enzimmal, és egy olyan DNS fragmenst lehet ide beiktatni, amelynek végei összeférhetők ezzel a restrikciós hellyel, és amely hordozza a másik par területet, jelen példában a par A területet. Egy par B terület beiktatását hasonló módon egy olyan plazmidba, amely már hordoz egy par A területet, szintén lehet alkalmazni.

Az eddigiekkel összhangban azok az érdekesebb plazmidok, amelyekben az R₁ par A területet és R₁ par B területet tartalmazó beiktatott DNS fragmens hossza nem haladja meg a kb. 6 kb-t, előnyösen nem haladja meg a 4 kb-t és különösen előnyösen nem haladja meg a 3 kb-t. Amikor a beiktatott DNS fragmens az R₁ par A területet foglalja

magában, ez normálisan kb. 4 kb-t meg nem haladó hosszúságú, előnyösen nem több, mint kb. 2,5 kb hosszúságú és különösen előnyösen nem több, mint kb. 2 kb hosszúságú. Amikor a beiktatott DNS fragmens az R1 par B területet foglalja magában, ez normálisan kb. 2 kb-t meg nem haladó hosszúságú, előnyösen nem több, mint kb. 1,5 kb hosszúságú és különösen előnyösen nem több, mint 1 kb hosszúságú. A kis DNS fragmensek fentebb jelzett előnyös volta azonban nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a plazmidot a teljes EcoRI-A fragmens beépítésével stabilizáljuk; ez pl. akkor lehetséges, amikor a stabilizálendő plazmid mérete kevésbé kritikus. Ha a fragmenst teljes egészében iktatjuk be, előnyös lehet átvizsgálási célok miatt olyan DNS fragmenst alkalmazni, amely antibiotikum rezisztenciát közvetítő génnel rendelkezik. Ha azonban bizonyos okból kívánatos az EcoRI-A fragmens méretét csökkenteni, ezt különböző utakon lehet végrehajtani, pl. az EcoRI-A fragmens részleges restriktívójával Pst I restriktívó enzim segítségével, vagy úgy, hogy az R1 par területeket a nagy fragmenstől levágjuk, és a területeket egymás után ugyanabba a DNS fragmensbe átviszük, amelyet azután a stabilizálendő plazmidba beiktatunk.

A találmány szerinti módon stabilizált plazmidok lehetnek vagy olyan plazmidok, amelyek természetes rokonságban vannak a beiktatott megosztó területtel, mint pl. R1 miniplazmidok, amelyeket egy beiktatott R1 par terület segítségével stabilizálunk (az R1 miniplazmidokból el van távolítva sok eredeti R1 DNS, következésképpen önmagukban általában nem tartalmazzak R1 par területet), vagy olyan plazmidok lehetnek, amelyeknek nincs természetes rokonságuk a megosztási funkcióval. Érdekes megemlíteni, hogy a találmány szerint hasznos, hatásos megosztási funkció nem csupán azoknak a plazmidoknak a kielégítő stabilitását képes biztosítani, amelyekkel természet szerint rokon, mint pl. az R1 miniplazmid stabilizálása esetében egy R1 par területtel, hanem olyan plazmidoknak is, amellyel a megosztási funkciónak nincs természet szerinti rokonsága. Az utóbbira példa egy R1 par terület beiktatása egy nem-R1 plazmidba, mint pl. egy pMB1 plazmidba vagy annak származékába, pl. pBR 322 plazmidba vagy annak származékába (ezek a plazmidok rendszeren stabilak, de hajlamosak nem-stabilá válni, amikor a plazmiddal természet szerint nem rokon gént vagy géneket iktatnak beléjük). Egy másik példa egy R1 par terület alkalmazása bizonyos plazmidtípusok stabilizálására, amelyek a plazmidot befogadó baktériumok tenyésztésének legalább egy szakaszában, kis kópiaszámmal rendelkeznek, pl. 0,5-5 kópia sejtenként, ilyenek a kis kópiaszámú, széles gazdatartománnyal rendelkező plazmidok [olyan plazmidok, amelyek képesek replikálódni több különböző

gazdatörzsből vagy fajban; ide tartoznak az úgynevezett „ingázó” (shuttle) vektorok, amelyek két vagy több típusú mikroorganizmusban képesek replikálódni és származékaik, pl. az RK2. A stabilizálást igénylő Inc F II összeférhetetlenségi csoportba tartozik az R1 plazmidon kívül az R100 és R6 is. Egy R1 par terület alkalmazása nem stabil F plazmidok stabilizálására szintén a jelen találmány oltalmi körébe esik.

A találmány szerinti stabilizálás fontos az úgynevezett feltételesen „megvaduló” replikációs plazmidok esetén, azaz olyan plazmidok esetén, amelyek abban az esetben, ha az illető plazmidot befogadó gazda mikroorganizmust bizonyos körülmények között tenyésztjük, konstans kis plazmid kópiaszámot mutatnak, míg abban az esetben, ha az illető plazmidot befogadó mikroorganizmust bizonyos más körülmények között tenyésztjük, elvesztik replikációs szabályozásukat, és a plazmid kópiaszáma exponenciálisan növekszik mindaddig, amíg a gazdasejt meg nem szűnik növekedni. A „megvaduló” („runaway”) replikációs plazmidok, amelyek esetén a találmány szerinti stabilizálás különösen létfontosságú, az olyan plazmidok, amelyek kópiaszáma nem haladja meg a 3-5-öt sejtenként, és különösen azok, amelyek kópiaszáma nem haladja meg a 0,5-1 kópiát sejtenként (a 0,5 szám úgy értendő, hogy a replikációs gyakoriság kevesebb, mint 1 sejt-ciklusonként), abban az esetben, ha az illető plazmidot befogadó mikroorganizmust olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek ilyen kis plazmid kópiaszámot biztosítanak, míg abban az esetben, ha a gazda mikroorganizmust bizonyos más körülmények között tenyésztjük, amelyek egy lényegesen megnövekedett plazmid kópiaszámot biztosítanak legalább 500-1000 kópia/sejt kópiaszámot mutatnak.

A bizonyos körülmények közötti (általában alacsony hőmérsékleten, kb. 30 °C körüli hőmérsékleten) kis plazmid-kópiaszám akkor kívánatos, amikor plazmidot használunk vektorként olyan idegen gének beiktatására, amelyek a gazdasejtre részben toxikus vagy letális termékeket kódolnak, mivel a plazmid pl. alacsony hőmérsékleten kis sebességgel replikálódik, a gének csupán kis mennyiségben fejeződnek ki, ha egyáltalán kifejeződnek, így a sejtek nem károsodnak a tenyésztés sokszorozódási szakaszában. Az ilyen rendkívüli kis kópiaszámmal rendelkező plazmidokban azonban - amely kis kópiaszám a fentebb említett sokszorozódási szakasz körülményei között, pl. alacsony hőmérsékleten történő tenyésztés esetén alakul ki - a par terület hiánya azt eredményezi, hogy a 3-5 kópia/sejt kópiaszámmal rendelkező plazmid a mikrobiológiai populációból generációnként mintegy 1% gyakorisággal elvesz, amikor ezeket a sejteket kis kópiaszámot biztosító körülmények között tenyésztjük. A plazmid elvesztésének gyakorisága olyan plazmidok-

nál, amelyek kópiaszáma nem haladja meg a 0,5-1 kópia/sejtet, körülbelül 5%/sejt/generáció.

Nyilvánvaló, hogy valamiféle megosztási funkció nélkül, amely stabilizálja ezeket, a plazmid eltűnhet a sejtekből, mielőtt a sejtek elérnék azt a sűrűséget a tápközegben, amely gazdaságos lenne a „megvaduló” replikáció beindításához; ez különösen fontos nagy mennyiségű termelés esetében, amikor a sejt több száz generációja szükséges, hogy elérjük a termelő méretű tenyészetet.

Az ilyen „megvaduló” replikációt feltétellessé lehet tenni egy szabályozható promotor beiktatásával a plazmid eredeti replikációs szabályozó génje(i)vel ellenkező irányban (ennek a részletes leírása megtalálható jelen bejelentők ezzel a bejelentéssel összefüggő másik bejelentésében, amelynek címe: „Feltételesen szabályozatlan replikációs viselkedésű plazmidok”, és amelyet ugyanazon napon nyújtottak be, mint a jelen bejelentést). Számos különböző típusú plazmid lehetséges, amely „megvaduló” replikációs viselkedéssel rendelkezik, de az előnyös „megvaduló” replikációs plazmidok az R1-típusú plazmidok.

A jelen értelmezésben a „stabilitás” (és az ezzel rokon kifejezések) azt kívánják jelenteni, hogy a gazdasejtből a plazmid elvesztésének gyakorisága kevesebb, mint $2 \cdot 10^{-4}$ (sejt) generáció. Valójában egy Par funkció beiktatásával a plazmidba lehet olyan plazmidokat is nyerni, amelyek éppen olyan stabilak, mint a vad típusú plazmidok, azaz az elvesztésük gyakorisága kevesebb, mint $3 \cdot 10^{-6}$ (sejt) generáció, amely megfelel a gének mutációs gyakorisági szintjének. Ez utóbbi elvesztési gyakorisági (LF) érték akkor valósul meg, amikor a plazmidot mind R1 par A területtel, mind R1 par B területtel stabilizáljuk, mint pl. amikor a teljes EcoR1-A fragmenst beiktatjuk a plazmidba.

Amint korábban említettük, az R1 plazmid Par⁺ fenotípusa viszont az EcoR1-A fragmenszen elkülönült par területeken helyezkedik el. Úgy találtuk, hogy ezeknek a par területnek mindegyike stabilizáló hatást fejt ki a nem stabil plazmidokra, amely plazmidokat úgy is meghatározhatjuk, mint stabilizáló- vagy megosztási funkció-hiányos plazmidokat. Az ilyen plazmidok, amelyek fenotípusosan Par⁻ típusúak, általában kisebb

vagy nagyobb gyakorisággal elvesznek a gazdasejtből; így pl. az R1 plazmid származékok, amelyekből a par terület hiányzik, mintegy $1,5 \cdot 10^{-2}$ (sejt) generáció gyakorisággal vesznek el a gazdasejtből. Hasonlóképpen a p15 plazmid származékok, amelyek Par⁻ típusúak, kb. $1 \cdot 10^{-2}$ (sejt) generáció gyakorisággal tűnnek el, és néhány pMB1 plazmid származék (pBR 322) (pl. egy olyan, amelyet a 3.3 példában leírtunk), $6 \cdot 10^{-3}$ (sejt) generáció gyakorisággal tűnhet el. Ezzel szemben a vagy par A-val, vagy par B-vel stabilizált R1 plazmidok kb. 10^{-4} /sejt/generáció LF-értékkel rendelkeznek, ez százszoros stabilizálásnak felel meg, amely egy nem-stabil vektorba beiktatott, ezeknek a par területeknek valamelyikét hordozó DNS fragmensnek tulajdonítható; ugyanezek a számok a megfelelő p15 származéknál kb. $8 \cdot 10^{-4}$ (Par A⁺), $1 \cdot 10^{-6}$ (Par B⁺), a megfelelő pMB1 származéknál $5 \cdot 10^{-5}$ (Par B⁺). Az olyan plazmidok, amelyek mind a par A, mind a par B területet hordozzák, kb. 10^{-6} /sejt/generáció LF-értékkel bírnak, vagyis egy 10^4 -szeres stabilizáló hatásról van szó. A könnyebb áttekintés érdekében a különböző eredetű stabilizált és nem stabilizált replikonok eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be. Ez azt jelzi, hogy mindegyik par terület a másiktól függetlenül működik, valamint azt, hogy a par területek hozzávetőlegesen egyformán hatásosak a stabilizálásban, legalábbis az R1 és p15 plazmidoknál, és azt, hogy ténykedésük és hatásuk összeadódik. Ezt a jelenséget akkor lehet hasznosítani, amikor meghatározzuk azt a mértéket, amelyre egy nem-stabil plazmidot stabilizálni kell. Ha kevésbé drasztikus stabilizálás szükséges, azaz ha úgy becsüljük, hogy a stabilizálandó plazmid nem túlságosan labilis [kisebb, mint 10^{-2} /sejt/generáció LF-értékű], elegendő beiktatni egy olyan DNS-fragmenst, amely a par területeknek csak egyikét tartalmazza, így is kielégítő stabilitást lehet elérni, azaz olyan stabilitást, amely elejét veszi a plazmidok fokozatos elvesztésének nagy-méretarányú baktériumpopuláció előállításánál több száz generáción keresztül. Másrészt viszont ha a plazmid nagyon kevésbé stabil [nagyobb, mint 10^{-2} /sejt/generáció LF-értékű], szükséges vagy legalábbis előnyös mindkét par területet beiktatni, hogy biztosítsuk a plazmidok rendkívüli stabilitását.

1. Táblázat
Különböző replikonok veszteség/sejt/generáció gyakoriságai

A replikon típusa	A veszteség gyakorisága (10^{-4} /sejt/generáció)				
	Par ⁻	Par fenotípus			Par A ⁺
		Par A ⁺	Par B ⁺		
R1	150	0,6	1,0		0,04
p15	100	8,0	0,01		0,01
pMB1 (pBR 322)	60	ND ¹	0,5		0,1

¹ND = nincs adat

Ezeket a mérhető LF-értékeket akkor lehet hasznosítani, amikor bármely fentebb meghatározott típusú plazmidot vektorként alkalmazunk géntermékek előállításában, és ezek legalább egy olyan gént tartalmaznak, amely a plazmida természet szerint nem rokon. A találmány egy további tárgya tehát egy géntermék előállításának eljárása plazmid DNS-ről, amely szerint egy, a fentebb leírt jellemzők bármelyikével bíró par-stabilizált plazmidot befogadó baktériumot tenyésztünk, és a plazmid géntermékét a baktériumtenyésztésből kinyerjük. A tenyésztést önmagában ismert módon végezzük, beleértve a hagyományos tápközegeket, amelyek optimálisak a szóban forgó baktériumfaj számára. Erdemes megjegyezni, hogy a stabilizálás következtében nincs szükség speciális tápközeg-összetételre. A géntermék kinyerése szintén jól ismert módszerekkel történik, amelyeket a szóban forgó, elkészített géntermékekhez és tulajdonságaihoz, a gazdabaktérium tulajdonságaihoz, stb.-hez igazítunk. A tenyésztést legalább 100 baktériumgeneráción át folytatjuk, nagy mennyiségű termelésnél a sejtgenerációk száma, amely szükséges a baktériumok szaporításához, meghaladhatja a 100 generációt. Ilyen körülmények között a plazmid LF értékét úgy lehet megválasztani a benne levő par terület segítségével, hogy a plazmid-vesztés kevesebb legyen, mint $2 \cdot 10^{-4}$ /sejt/generáció. Ezt az LF értéket általában el lehet érni egyetlen par területtel is. Bizonyos esetekben azonban előnyös kevesebb, mint 10^{-5} /sejt/generáció, még előnyösebb kevesebb, mint $5 \cdot 10^{-6}$ (sejt)generáció LF értéket beállítani.

Bár ezeket a nagyon kis LF értékeket bizonyos esetekben el lehet érni csak egyetlen par terület beiktatásával (elsősorban R1 par B területtel), mégis általában szükséges mindkét R1 par terület jelenléte.

A találmány egy további tárgya eljárás olyan baktériumok előállítására, amelyek a fentebb meghatározott típusú plazmidokat tartalmaznak. A találmány szerinti plazmidok különleges előnye, hogy nem szükséges különleges mutánsok vagy törzsek a plazmid fenntartásának biztosítására, így bármilyen ilyen plazmidot befogadni képes baktériumfaj és törzs alkalmazható, mint pl. gram-negatív baktériumok. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható olyan baktérium, amelyben a plazmidok szaporodni és stabilitásukat fenntartani képesek, például az *Escherichia coli*.

Végül a találmány tárgya eljárás olyan DNS fragmens előállítására, amely fő komponensként egy R1 par területet tartalmaz. Ez azt jelenti, hogy lényegileg minden DNS fragmens, amely be van iktatva a gazda-plazmidba, valamelyik vagy mindkét par területet tartalmazza, és a DNS többi része azt a célt szolgálja, hogy alkalmas restrikciós helyeket szolgáltasson a befogadó plazmidon levő megfelelő restrikciós helynél történő be-

iktatáshoz. Az R1 par A és R1 par B terület tartalmazó, beiktatott DNS fragmens hossza - ezzel az elvvel összhangban - nem haladhatja meg a kb. 6 kb hosszúságot, előnyösen a kb. 4 kb hosszúságot, és még előnyösebben a 3 kb hosszúságot. Amikor a DNS fragmens az R1 par A területet foglalja magában, ez normálisan nem haladja meg a kb. 4 kb hosszúságot, előnyösen a kb. 2,5 kb hosszúságot, és különösen előnyösen a kb. 2 kb hosszúságot. Amikor a DNS fragmens az R1 par B területet foglalja magában, ez normálisan nem haladja meg a kb. 2 kb hosszúságot, előnyösen a kb. 1,5 kb hosszúságot, és különösen előnyösen a kb. 1 kb hosszúságot. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy az ilyen kicsiny és ennél fogva könnyen beiktatható DNS fragmensek megőrzik stabilizáló funkciójukat akkor is, amikor a restrikciós enzimes térképezéssel a par A terület egy kb. 1800 bp (bázispár) területre szűkül és a par B terület kb. 900 bp-re szűkül. Lehetséges, hogy a Par⁺ fenotípust ténylegesen szolgáló gén vagy gének még ennél is kisebbek.

A Par⁺ fenotípussal rendelkező hibrid plazmidok megalkotásában komoly problémát jelent az ilyen fenotípusra történő átvizsgálás gyors és egyszerű módszerének hiánya. Általában az alkalmas hibrid-plazmidot a Par⁺ fenotípussal lehet azonosítani, amely a plazmid nagy stabilitását eredményezi a plazmid szelekciós kényszer nélküli növekedése során. Az ilyen típusú átvizsgálás azonban hosszadalmas, és csak akkor helytálló, ha a szülő plazmid nem stabilan öröklődött. Egy másik átvizsgálási módszert fejlesztettünk ki, amelyet az alábbiakban ismertetünk:

a.) Átvizsgálás a par A fragmens beiktatására nézve.

Ha ugyanabban a sejtben két különböző, (össze nem férő csoportokból származó), plazmid van jelen, amelyek mindegyike hordoz par A⁺ területet, ezek kiűzik egymást egy bizonyos gyakorisággal (összeférhetetlenség), valószínűleg azért, mert ezek versengenek a sejtben levő megosztási apparátusért. Az ilyen par által közvetített összeférhetetlenségi fenotípus-fajtát a par hibridek átvizsgálásához lehet hasznosítani, így pl. egy Par A⁺ plazmidot át lehet vinni egy olyan *lac E. coli* törzsbe (pl. CSH 50 törzsbe), amely más olyan plazmidot is tartalmaz, amely *lac* géneket és a par A⁺ területet hordozza. Normálisan a belépő plazmid par⁺ által közvetített összeférhetetlenséget fejt ki a bent lévő Par A⁺ plazmid ellen. A bent lévő plazmid Lac⁺ fenotípusa miatt az ilyen összeférhetetlenség könnyen kimutatható, ha a transzformánsokat csak a belépő plazmidban talált rezisztencia-marker alapján szelektáljuk, míg a bent lévő plazmid jelenléte vagy távolléte jelezhető egy indikátor szubsztlátumon, pl. McConkey laktóz lemezen. Az ilyen

lemezekről egy újabb, hasonló lemezre készített (replika lemez telepek) kimutatják a bent levő (rezidens) plazmid kiűzésének még alacsony szintjét is szintelen telepek formájában, amelyek a Lac⁻ sejtek megjelenésére utalnak. További stabilitási vizsgálat vagy még kiterjedtebb összeférhetlenségi vizsgálat szükséges a lehetséges par A* hibrid plazmid tulajdonságainak vizsgálatához. Ezen az úton - a belépő és bent levő plazmidok megfelelő (összeférhető) kombinációját is beleértve - az Inc⁺ (Par⁺) fragmensek bármilyen, stabil vagy nem stabil plazmidba történő beiktatására nézve gyorsan elvégezhető az átvizsgálás.

b.) Átvizsgálás a par B* fragmens beiktatására nézve.

Mivel azt már bemutattuk, hogy két nem rokon plazmid, amelyek mindegyike hordoz par B* területet, összeférhetetlen egymással, ugyanazt az átvizsgálási stratégiát lehet alkalmazni a par B* hibridek kialakításánál, mint amelyet a par A* hibridek kialakításánál leírtunk.

c.) Átvizsgálás a par A*, par B* fragmensek beiktatására nézve.

A fenti leírás szerint lehetséges mind a par A*, mind a par B* hibrid plazmidok kiűzése, ezen kívül azonban az EcoRI-A fragmens a Tn 5 beiktatással lehetővé teszi a par A*, par B* fragmenseket hordozó plazmidok közvetlen szelekcióját (Km^R). Így a fragmens nagy mérete ellenére még nagyon kis hibridek is könnyen szelektálhatók. Egy kisebb DNS fragmens, amely mindkét par* területet tartalmazza, természetesen összeférhetlenséget mutat mind a par A*, mind a par B* plazmidok ellen.

AZ ÁBRÁK MAGYARÁZATA

Többször hivatkozunk az ábrákra, amelyek közül a 1-5. és 7-17. ábrák a példákban leírt plazmidok restrikciós térképét mutatják be. A 6. ábra az R1-ből származó PstI-D fragmens részletes (nem méretarányos) térképét mutatja, és a

18. ábra a különböző par területeket hordozó replikon különböző típusú stabilitási görbéit mutatja be a Par⁻ replikonokkal összehasonlítva.

Az 1-5. és 7-17. ábrákon a példákban leírt plazmidok lineáris restrikciós térképét mutatjuk be, amelyekben a plazmidok fenotípusát és genotípusát a vízszintes vonal fölött jelezzük, amely a szülő plazmidokat jelenti. Így par A képviseli az R1 plazmid plazmid-fenntartást biztosító területeinek egyikét, par B képviseli az R1 plazmid másik plazmid-fenntartást biztosító területét, ica I egy gént képvisel, amely a colicin E1-re való immunitást közvetíti; ori vagy ori V képviseli a plazmid-replikáció kezdetét; bla egy olyan

gént jelent, amely az ampicillin-rezisztenciát kódolja; IR egy fordított ismétlődő szerkezetet jelent Tn 5-ön; Km^R kanamicin-rezisztenciát jelent; Cm^R klóramfenikol rezisztenciát jelent; Ap^R ampicillin-rezisztenciát jelent; Tc^R tetraciklin-rezisztenciát jelent; rep A egy olyan gént képvisel, amely egy, az R1 replikációhoz szükséges fehérjét kódol; lac Z, lac Y és lac A a beiktatott lac operont jelentik, amelyek közül lac Z kódolja a β-galaktozidázt, lac Y kódolja a permeázt, és lac A kódolja a transzaciázát; rep A - lac Z' a rep A és lac Z gének közötti fúziót jelenti; cop B egy olyan gént jelent, amely egy olyan polipeptidet kódol, amely (az R1 plazmidok) rep A promotorjáról történő átírást visszaszorítja; cop A egy olyan gént jelent, amely egy olyan RNS molekulát kódol, amely gátolja a Rep A-RNS átírást; Cla⁸⁷ egy olyan gént képvisel, amely egy a λ P_R promotor-aktivitást szabályozó hőmérséklet-érzékeny λ represszort kódol; P_{deo} pedig a deo promotort képviseli. A nyilak mutatják az átírás irányát és a „háromszög”-ek mutatják a DNS-beiktatásokat. A betöltött területek és az üres területek a beiktatott géneket, a pontozott vonalak a kihagyást (deléciót) jelzik.

A vízszintes vonal alatt a restrikciós enzimekhez tartozó helyeket jelöltük, amelyben E jelzi az EcoRI-t; P jelzi a PstI-t; B₁ jelzi a BamHI-t az 1. és 5. ábra kivételével, ahol a Tn 5 DNS-en kívül, az Bal I-t jelöl; H₁ jelzi a HpaI-t; Ev jelzi az EcoRV-t; B₂ jelzi a Bgl II-t; S₁ jelzi a Sal I-t; H₃ jelzi a Hind III-at; és C jelzi a Cla I-et.

A 6. ábrán a Pst I-D fragmens további térképezését mutatjuk be, a vízszintes vonal fölötti számjegyek a restrikciós helyek közötti bázispárok számát jelzik. A vízszintes vonal alatt a restrikciós enzimekhez szolgáló helyek vannak jelölve, ahol R₁ jelentése RsaI; P Pst I-et; és H₁ HPA I-et jelent.

A 18. ábrán a példákban megalkotott és vizsgált R₁, p15 és pBR 322 származékokhoz tartozó stabilitási görbéket ábrázoltuk. Minden egyes görbe legalább két folyadéktényeztetnek az átlagát képviseli, amelyeket több, mint 100 generáción át folytattunk. A számokból az tűnik ki, hogy a mind a par A-t, mind a par B-t tartalmazó plazmidok rendkívül stabilan öröklődnek, amely ugyanúgy igaz abban az esetben is, amikor egyedül par B-t tartalmazó plazmidokról és egyedül par A-val stabilizált mini R1 plazmidokról van szó.

A Par⁻ plazmidokhoz tartozó görbékben az tűnik ki, hogy kezdetben a plazmidhordozó sejtek gyakorisága exponenciálisan csökken, ahogyan ez el is várható az elvesztés konstans sebessége miatt. A későbbi szakaszokban a plazmidhordozó sejtek gyakorisága gyorsabban csökkenőnek látszik (teljes vonallal jelölve), ami a plazmidmentes sejtek kissé gyorsabb növekedési sebességének tulajdonítható. A szaggatott vonallal jeleztük a

gyorsabb növekedés alapján történt kiigazítást, ami a tényleges elvesztési gyakoriságot mutatja.

Ezzel ellentétben azok a plazmidok, amelyek fenotipikusan Par⁻ típusúak, $1,5 \cdot 10^{-2}$ /sejt/generáció gyakorisággal vesznek el R1 plazmidoknál, $1 \cdot 10^{-2}$ /sejt/generáció gyakorisággal a p15 plazmidoknál és $6 \cdot 10^{-3}$ /sejt/generáció gyakorisággal néhány pBR 322 plazmidnál (egy ilyen mutatunk be a 3.3 példában). Valóban, a p15 Par⁻ és a pBR 322 Par⁻ származékok elvesztési gyakorisága meglepően nagy, ha ezeknek a vektoroknak a kópiaszámát figyelembe vesszük. Így pl. a p15 kópiaszáma 15-20 körül mozog sejtenként, ami 10^{-9} /sejt/generáció elvesztési sebességet jelent, ha a plazmidok binomiális eloszlását tételezzük fel. A megfigyelt nagy elvesztési arány könnyen megmagyarázható azzal a ténnyel, hogy a p15 replikonok a rec A-függően kapcsolt egységet képeznek, valószínűleg egy loxP-szerű felbontó (resolúciós) funkció hiánya miatt. (Austin és munkatársai, Cell, 25, 1981, 729-36 oldal). A pBR 322 származékokról is ismeretes, hogy kapcsolt egységeket képeznek, és amikor a kópiaszám csökken pl. a nagy klónozott fragmensek miatt, jelentős instabilitás jön létre.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az alkalmazott Escherichia coli K-12 törzs CSH50 volt (Δ pro-lac, rpS L; lásd: Miller, J.: Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, 1972). Többféle plazmidot és bakteriofágot használtunk (lásd 2. táblázat).

Az alkalmazott kísérleti technikák standard technikák, amelyeket a mikrobiológiai genetika terén (Miller, J.: Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, 1972), valamint a genetikai manipulációk terén (Davis, Batstein és Roth: A Manual for Genetic Engineering; Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor, New York, 1980) általában használnak.

Az összes sejtet LB tápközegen tenyésztettük (Bertani: J. Bact. 62, 1951, 293 oldal), amely 0,2% glükózzal és 1 μ g/ml timinnal volt kiegészítve; vagy A+B minimális tápközegen (Clark és Male, J. Mol. Biol. 23, 1967, 69. oldal), amely 0,2% glükózzal és 1% kazamino-savval volt kiegészítve. Az alkalmazott lemezek LB tápközeg és 1,5% agart tartalmazó LA lemezek voltak.

A McConkey laktóz indikátorlemezeket a gyártó cég (Difco) ajánlása szerint készítettük, és az X-gal lemezeket 20-40 μ g/ml 5-brom-4-klór-indolil- β -D-galaktozid hozzáadásával A+B minimáltápközegből készítettük, amely még 0,2% glükózzal és 1 μ g/ml tiaminnal volt kiegészítve.

Fiziko-kémiai módszerek

A tiszta lizátumokat a Clewell és Helinski által leírt módszerrel készítettük (Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 62, 1962, 1159-66. oldal).

A plazmid DNS kis mennyiségű készítését Birnboim és munkatársai módszere szerint hajtottuk végre (Nucl. Acids Res. 7, 1979, 1513-23. oldal).

A plazmid DNS nagy mennyiségű készítését Boyant festék sűrűség gradiens centrifugálással hajtottuk végre Stougaard és Molin szerint (Anal. Biochem. 118, 1981, 181. oldal).

A DNS-preparátumok poliakrilamid-gél elektroforézisét és agaróz gél elektroforézisét lényegében a Molin és Nordström által leírt módszerrel hajtottuk végre [Methods in Plasmid Biology, Odense University (Odense Egyetem) 1982].

A restriktív endonukleázokat a gyártó által nyújtott előírásokkal összhangban használtuk (Boehringer, Mannheim vagy Biolabs, New England) 37 °C hőmérsékleten. Kétszeres és háromszoros emésztést, azzal az enzimmel kezdtük, amely a legkisebb sókoncentrációt igényli, majd további pufferrel végeztünk beállítást, mielőtt a következő enzimet hozzáadtuk volna.

A Bal 31 exonukleázzal történő kezelést a következőképpen hajtottuk végre; 0,1 egység Bal 31-et adtunk 50 μ g lineáris DNS-hez, és mintákat vettünk ki az 1., 2., 4., 8., 16., 32. és 60. percben 60 mmól/literes EDTA-hoz, fenollal extraháltuk, etanollal kicsaptuk, és újra szuszpendáltuk 20 μ l TE pufferban. A 20 μ l felét a megfelelő restriktív enzimmel emésztettük, és agaróz gél elektroforézisnek vetettük alá, hogy meghatározzuk a törölt DNS-törölések átlagos méretét. A másik feléhez a megfelelő kapcsolót (linkert) adtuk hozzá, és a keveréket összekapcsoltuk (ligáltuk) 48 órán át a főlös mennyiségű T4 DNS ligázzal.

A hasított plazmid DNS összekapcsolását a gyártó által ajánlott módszerrel hajtottuk végre a tompa vég-kapcsolás kivételével, ahol a T4 DNS ligáz és ATP feleslegét adagoltuk.

Mikrobiológiai módszerek

I. megosztási vizsgálat: A Lac⁺ vektorok megalkotása lehetővé tette a plazmid Par⁺ fenotípusának meghatározását egyszerűen szélesztve nem-szelektív McConkey laktóz lemezen vagy X-Gal lemezen. Az ezeket a plazmidokat befogadó baktériumok (Δ lac) Lac⁺ fenotípust közvetítenek, amelyet könnyen lehet jelezni színes telepként az indikátor lemezen, míg a plazmidmentes sejtek Lac⁻ fenotípusúak és színtelen telepekként jelennek meg.

II. megosztási vizsgálat (Lac⁻ plazmidokhoz használt): Egy szelektív lemezező (antibiotikumot tartalmazó lemez) egy telepet szélesztettünk egy másik szelektív lemezre. Erről a lemezezőről egy telepet szélesztettünk egy LA lemezre, úgy, hogy egyedi telepek képződjenek. Az LA lemezezőről mintegy 10 telepet szuszpendáltunk 1 ml 0,9%-os NaCl oldatban

10^{-4} , illetve 10^{-5} arányú hígításban. A 10^{-4} és 10^{-5} hígításokból 0,1 ml-t szélesztettünk LA lemezekre. Ezekről a lemezekről 50 telep ellenálló mintáját vizsgáltuk a megfelelő szelektív lemezekre (illetve 200 telepét, ha az instabilitás várhatóan gyenge volt). Az elvesztés gyakoriságát (LF érték) a következő képlet alapján számítottuk ki:

$$LF = 1 - (\bar{V})^{(1/27)}$$

ahol \bar{V} jelentése a plazmidot hordozó sejtek gyakorisága, feltételezve, hogy egy telep 27 generáción keresztül nő. Ehhez a módszerhez hozzátartozik a nagy statisztikai ingadozás.

III. megosztási vizsgálat: A Lac^+ és Lac^- plazmidok stabilitásának kvantitatív mérése. Egy teljes telepet felvettünk egy szelektív lemezről, és 10^8 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk kb. 1 ml 0,9%-os NaCl oldatban. 10^{-3} hígítású szuszpenziókból 2 x 0,1 ml-t használtunk 2 x 10 ml LB-tápközeg inokulálására, és az inkubálást 30 °C hőmérsékleten rázás közben hajtottuk végre. Kb. $5 \cdot 10^8$ sejt/ml sejtsűrűségnél a tenyészeteket 10^4 -szeresre illetve 10^5 -szeresre hígítottuk. 0,1 ml-t használtunk fel a 10^4 -szeres hígításból ($5 \cdot 10^3$ sejt), hogy inokuláljunk 10 ml friss LB tápközegre, és 0,4 ml-t szélesztettünk a 10^5 -szeres hígításból McConkey laktóz lemezekre, és a lemezeket 30 °C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk. A hígulás $5 \cdot 10^8$ /ml-ről $5 \cdot 10^2$ /ml-re 20 növekedési generációnak felel meg (2^{20}), így a változás a plazmidot viselő sejtek gyakoriságában az egyik hígítástól a következőig megfelel annak, amely a növekedés 20 generációja alatt történik. Általánosabban, az LF értéket a következőképpen lehet kiszámítani:

$$\bar{V}_1 = (1 - LF)^{g_1} \text{ és } \bar{V}_2 = (1 - LF)^{g_2}$$

ahol \bar{V}_1 és \bar{V}_2 a plazmidot viselő sejtek gyakorisága g_1 , illetve g_2 generációk után, és LF az elvesztés gyakorisága/sejt/generáció. Ebből az következik, hogy

$$\bar{V}_1/\bar{V}_2 = (1 - LF)^{g_1 - g_2}$$

és

$$LF = 1 - (\bar{V}_1/\bar{V}_2)^{1/(g_1 - g_2)}$$

Ezt a képletet használva a zéró időpontban az inokuláló sejtek számában levő ingadozás miatti hibák elkerülhetők. A képletnek egy sokkal kényelmesebb megközelítése a következő képlet:

$$LF = \ln(\bar{V}_1/\bar{V}_2)/(g_1 - g_2)$$

Összeférhetetlenségi vizsgálat.

Olyan plazmidokat, amelyekről azt lehetett vélni, hogy beiktatott par területet hordoznak, vizsgáltunk át azon az alapon, hogy két egyébként összeférhető replikon, amelyek ugyanazt a par területet hordozzák, összeférhetetlen egymással, és szelekciós kényszer hiányában egyik vagy másik elvész. A vizsgálatot úgy végeztük, hogy a vizsgálandó plazmidot transzformáltuk egy másik plazmidot hordozó baktériumtörzsbe, mindkét plazmidra szelektálva duplán szelektív lemezen. A duplán szelektív lemezen (két különböző antibiotikumot tartalmazó lemez) szélesztés után az összeférhetetlenség mind kvalitatívan, mind kvantitatívan mérhető.

A kvalitatív összeférhetetlenségi vizsgálathoz egy telepet a duplán szelektív lemezről szélesztettünk egy LA lemezen, egyedi telepeket képezve. Erről a lemezről kb. 10 telepet szuszpendáltunk 1 ml 0,9%-os NaCl oldatban, és 10^{-4} , illetve 10^{-5} arányban hígítottuk. A 10^{-4} és 10^{-5} hígításból 0,1 ml szuszpenziót szélesztettünk LA lemezekre. Ezekről a lemezekről 50 telepet (vagy ha gyenge összeférhetetlenség volt várható, 200 telepet) vizsgáltunk a megfelelő szelektív lemezekre. Ha egy Lac^+ plazmid volt érdekelve a vizsgálatban, McConkey laktóz indikátor lemezeket használtunk a szelektív lemezekre történő replika-lemez készítés helyett. Lac^+ plazmidok esetében az átvizsgálást úgy hajtottuk végre, hogy a Par^+ plazmidnak vélhető plazmidot transzformáltuk egy olyan törzsbe, amely már tartalmazott egy Lac^+ fenotípust közvetítő Par^+ hibrid plazmidot. A plazmid-összeférhetetlenség és következtésképpen a belépő plazmid fajlagos Par^+ fenotípusának bizonyítása könnyen észlelhető a Lac^- telepekre történő átvizsgálással McConkey lemezekre, kimutatva, hogy a bent levő (rezidens) Par^+ plazmid destabilizálódott. Az ilyen átvizsgálási eljárást mutatunk be a 4. példában.

A kvantitatív összeférhetetlenséget a Lac^+ plazmidok elvesztési gyakoriságának mérésével végeztük, miután a fentebb leírt heteroplazmid populáció kialakult. Az LF értékeket a korábban leírt III. megosztási vizsgálat szerint mértük.

50

Genetikai technikák

A baktériumok transzformációját Cohen és munkatársai szerint végeztük (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62, 1972, 2110-2114. oldal), azzal a módosítással, hogy amikor kis transzformációs gyakoriság volt várható, a megfelelő sejtek DNS-sel történő kezelését jégen több óra hosszat végeztük, és hő-sokk után a sejteket jégben 5-30 percre ismét lehűtöttük. Ez a kezelés szignifikánsan megnövelte a transzformációs gyakoriságot.

A \mathcal{M} bakteriofággal végzett fertőzést úgy hajtottuk végre, hogy 10 ml tenyészetet LB tápközegben, amelyet 0,2% maltózzal egé-

szitettünk ki (hogyan indukáljuk a mal B fehérjét, amely a λ receptor) egy éjszakán át növesztettünk rázatás mellett. A sejteket 0,9% NaCl oldattal mostuk, és 2 ml 0,01 mól/literes $MgSO_4$ oldatban szuszpendáltuk, majd 1 óra hosszat inkubáltuk. A szuszpenzióból hígításokat készítettünk (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}), és 0,1 ml-nyi hígított fág-oldatokat használtunk 0,2 ml éhező sejtsuszpenzió megfertőzésére. A fertőző keverék 10^0 , 10^{-1} és 10^{-2} hígításait szelektív lemezre szélesztettük.

A plazmidok Tn 5-tel (Km^R) történő transzponálásához (a Tn 5 λ_b 221 : : Tn 5 fág eredetű, amely a kapcsolás oldaláról törté-
lést tartalmazott, így nem volt képes lizogé-
nizálni), a fág szuszpenzióját alkalmaztuk az

olyan sejtek fertőzésére, amelyek azokat a plazmidokat tartalmazták, amelyekre a transzponálást végre akartuk hajtani. A fertőzést a fentebb leírtak szerint hajtottuk végre és a kanamicin-rezisztens sejteket kiválasztottuk. Több ezer Km^R telepet gyűjtöttünk össze, és ezek 10^{-2} hígításaiból 0,1 ml-t alkalmaztunk 100 ml LB tápközeg inokulálására. A tenyészetet egy éjszakán át növesztettük, és a plazmid DNS-t ebből a sejtkeverékből kinyertük és felhasználtuk *E. coli* K 12 törzs (CSH50) kanamicin rezisztenciára történő transzformálásához. (Az *E. coli* K12 CSH50 törzs beszerezhető a Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York, USA intézettől).

2. táblázat

Plazmidok és fágok

Plazmid/Fág	Forrás
pKN184	Nordström és munkatársai: Plasmid 4, 1980, 322. oldal
pSF 2124	So és munkatársai: Mol. Gen. Genet. 142, 1975, 239-49. oldal
pJL 99	Light és Molin: Mol. Gen. Genet. 184, 1981, 56-61. oldal
pGA 46	An és Friesen: J. Bact. 140, 1979, 70-79 oldal
pKN 501	Molin és munkatársai: J. Bact. 138, 1979, 70-79. oldal
pF 1403-11	Az F plazmid alap-replikonból származó AluINae I fragmens pMC 1403 Sma I helyére történő beiktatásával előállítva (Casadaban és munkatársai: J. Bact 143, 1980, 971. oldal), ezáltal az F plazmid E génje és a pMC 1403 lac Z génje között egy fúziót alakítva ki.
PHP 34	Prentki és munkatársai: Gene 17, 1982, 189-96. oldal
PMC 903	Casadaban és munkatársai: J. Bact. 143, 1980, 971. oldal
pKN 1562	Molin és munkatársai: J. Bact. 138, 1979, 70-79. oldal
pVH 1424	Valentin-Hansen P. szerint állítva elő, egy pVH 17 plazmidból (Valentin-Hansen és munkatársai: EMBO J. 1982, 317) származó deo promotort hordozó Sau 3 A fragmens beiktatásával a PMC 1403 plazmid BamH I helyébe (Casadaban és munkatársai, fentebb idézett hely, 971. oldal)
pSKS 104	Casadaban M. szerint állítva elő, a pM 13 mp 7-ből (Messing és munkatársai: Nucleic Acids Res. 9, 1981, 309) származó lac promotort és translációs beindító területet tartalmazó Pvu II fragmens beiktatásával a PMC 1403 Sma I helyére, amely műveletet homológ rekombináció követ a lac Z szegmensek között
pBR 322	Bolivar és munkatársai: Gene 2, 1977, 95. oldal
PMB 1	Betlock és munkatársai: Fed. Proc. 35, 1976, 2037-43. oldal
λ b 221 : : Tn 5	Berg, D. E.: transzponálható kanamicin rezisztenciát meghatározó Tn 5 beiktatása és kivágása DNS Insertion Elements, Plasmids and Episomes (A.I.Bukhari és munkatársai szerkesztésében)
ED λ 4	Dempsey és Willets: J. Bact. 126, 1976, 166. oldal

1. példa

Tn 5 (Km^R) beiktatása az R1-ből származó EcoRI-A fragmensbe:

*E. coli K 12 törzs (CSH50) sejtjeit - amelyek a pKN 184 plazmidot foglalják magukban, vagyis azt a plazmidot, amely pSF 2124 plazmidból és az R1 plazmidból származó 19 kb hosszúságú EcoRI-A fragmensből (amely a par A és par B területeket tartalmazza) áll - az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint a λ b 211 : : Tn 5 bakteriofág szuszpenziójával fertőztünk. A 200 μ g/ml kanamicint tartalmazó LA lemezen kanamicin rezisztenciára történő szelekció után a telepeket összegyűjtöttük és összekevertük. A fenti keverék 1 hígításából 0,1 ml-t használtunk 100 ml LB tápközeg inokulálásához. A tenyészetet egy éjszakán át növesztettük, és a tenyészetből preparált plazmid DNS-t az *E. coli* K 12 törzs (CSH50) trnszformálására használtuk, 200 μ g/ml kanamicint tartalmazó lemezekre kanamicin rezisztenciára szelektálva.*

Ilyen módon egy pOU1 plazmidot találtunk, amely a kanamicin-rezisztenciát közvetíti és amelynek van egy kb. 5 kb-nak (5000 bázispár) megfelelő fág-DNS beiktatása. A plazmid molekulatömege/mérete 34 kb, amelyet a plazmid DNS preparálásával és agaróz gélen történő analizisével mértünk, és fenotípusa a következő: Km^R, Ap^R, Par A⁺, Par B⁺.

A pOU1-ből a plazmid DNS-t kiperarál-
tuk és a plazmidot restrikciós enzimekkel feltérképeztük a plazmid DNS tisztításával, restrikciós enzimekkel történő elhasításával és a keletkezett fragmensek agaróz gél elektroforézissel történő analizisével (lásd 1. ábra). Ezen a módon a pKN 184 plazmid EcoRI-A fragmensébe beiktatott λ : : Tn 5 fragmenst azonosítottuk mint a Km^R-t kódoló gén hordozóját, és a fragmens elhelyezkedését az 1. ábrában bemutatottak szerint meghatároztuk. A pOU1 plazmidot további analízishez és plazmidkészítéshez használtuk.

Az *E. coli* CSH50/pOU1 törzset a Német Mikroorganizmusok Gyűjteményében (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Grisebach strasse 8, D-3400 Göttingen), amely törzsgyűjteményt a továbbiakban DSM-nek fogunk rövidíteni, a 2712. számon helyeztük letétbe.

2. példa

Par⁺ fragmensek klónozásához alkalmazható plazmidok készítése:

A pJL 99 plazmid (Light és Molin: Mol. Gen. Genet. 184, 1981, 56-61. oldal) egy fúziót hordoz az R1 plazmidból származó rep A gén és a lac operon között; ez a plazmid egy Lac⁺ fenotípust közvetít. A rep A-lac fúziót

12

hordozó Pst I - Sal I fragmenst kivágtuk a pJL 99-ből és beiktattuk a pGA46-ba, amely egy p15 replikon (An és Friesen: J. Bact. 140, 1979, 400-407. oldal), ilyen módon alkotuk meg a pJL 124 plazmidot. A plazmid térképét a 2. ábra mutatja be. A pJL 124 szintén közvetít egy Lac⁺ fenotípust McConkey laktóz indikátor lemezekre, de úgy találtuk, hogy olyan DNS fragmens beiktatás, amelynek a pJL 124 Pst I helyén nincs vagy csak nagyon csekély promotor aktivitása van, a rep A promotor aktivitásával olyan módon interferál, hogy ezek a hibridek már nem mutatnak Lac⁺-t McConkey laktóz indikátorlemezeken. A sokkal érzékenyebb X-gal indikátorlemezeken azonban a transzformáns telepek Lac⁺ típusúak, jelezve, hogy a β -galaktoszidáz kifejeződése csökkent, de nem teljesen szorult vissza ezekben a hibridekben.

Ennél fogva a pJL 124-et a Pst I fragmensek klónozására lehet használni, mivel a hibrid plazmidok könnyen kimutathatók McConkey laktóz indikátor lemezekre, mint Lac⁺ transzformánsok. Sőt, mivel a pJL 124 egy p15 replikon, és így nem stabil, amely könnyen kimutatható olyan sejtekként, amelyből a plazmid elveszett, így szintelen telepeket képez laktóz indikátorlemezeken szelekciós kényszer nélkül, a pJL 124-et stabilizálni képes Pst I-et ki lehet válogatni X-gal lemezekre.

A Pst I-par⁺ fragmensek izolálásának programja így a következő lépésekből áll:

- 1.) A Pst I-el hasított pJL 124 összekapcsolása (ligációja) egy másik plazmidból származó Pst I fragmensevel.
 - 2.) Klóramfenikolt tartalmazó McConkey laktóz lemezekre transzformáció CSH 50-be.
 - 3.) A klónok vizsgálata, amelyek Lac⁻-ként jelennek meg McConkey laktóz lemezekre, a Lac⁺ fenotípus stabil öröklődésére nézve X-gal indikátorlemezeken (lásd Anyagok és módszerek c. fejezet).
- Az *E. coli* CSH 50/pJL 124 törzset a 2760 számon helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

3. példa

par A és par B területekkel rendelkező nem stabil plazmidok stabilizálása

1.) Mini R1-replikon

pOU 71 plazmidot (DSM 2471) - ez a plazmid a pKN 1562 plazmid megvaduló replikációs származéka, amely az R1 plazmid alap-replikonját, az ED λ 4 fágól származó λ P₈ promotort és class⁺ represszor gént, a Tn 3 transzpozonból származó β -laktamáz kódoló gént és egy egyedi EcoRI helyet tartalmaz (a pOU 71 megalkotásának részletesebb leírása megtalálható a jelen találmány bejelentőinek a jelen bejelentéssel összefüg-

gő bejelentésében, amelynek címe: „Plazmidok feltételesen szabályozatlan replikációs viselkedéssel”, és amelyet ugyanaznap nyújtottak be, mint a jelen bejelentést) - EcoRI-el hasítottunk és a pOU1-ből származó EcoRI-A : : Tn 5 fragmenst (lásd 1. példa) iktattuk bele, ligáltuk, és E. coli CSH 50 törzsbe transzformáltuk, a kanamicin-rezisztens sejteket 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LA lemezekon szelektálva.

A transzformánsokat pOU 71 „megvaduló” replikációs fenotípusra 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LA lemezekon szélesztve és 42 °C hőmérsékleten inkubálva válogatjuk. Azok a sejtek, amelyek a „megvaduló” replikációs plazmidot tartalmazzák, abbahagyják a növekedést ilyen körülmények között. Ilyen módon a pOU 71-184 plazmidot azonosítottuk, amely 25,5 kb méretű és fenotípusa a következő: Par A⁺, Par B⁺, Ap^R, Km^R.

A plazmidot az 1. példában leírtak szerint restrikciós enzimekkel feltérképeztük (lásd 3. ábra). A restrikciós térképből kitűnik, hogy az EcoRI-A : : Tn 5 fragmens korrektül beiktatózott a pOU 71 plazmid EcoRI helyére.

A plazmidot befogadó sejteket LA lemezekon 100 generáción keresztül, szelekciós kényszer nélkül növesztettük, vagyis nem olyan lemezekon növesztve, amely antibiotikumot tartalmaz; amikor az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módszer szerint (II. megosztási vizsgálat) meghatároztuk, a sejtekből nem volt megfigyelhető a plazmid elvesztése, míg a pOU 71 a hasonló körülmények között nőtt sejtekből 1%/generáció gyakorisággal eltűnt. Így meghatározható tehát, hogy a pOU 71-184 stabilan öröklődik mintegy 10⁻⁶/sejt/generáció elvesztési gyakorisággal.

Az E. coli CSH 50/pOU 71-184 törzset 2763. számon helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

2.) p15 replikon

A pJL 124 plazmidot (lásd 2. példa), amely Par⁻ p15 replikon, Pst I restrikciós enzimmel elhasítottuk és összekevertük pKN 184 plazmiddal (lásd 1. példa), amelyet előzőleg Pst I-el elhasítottunk, majd ligáltuk. A ligált keveréket E. coli CSH 50 törzsbe transzformáltuk, 50 µg/ml klóramfenikolt tartalmazó McConkey laktóz indikátor lemezen szelektálva klóramfenikol-rezisztenciára.

A pJL 124-et befogadó sejteket, amelyek egy vagy több Pst I fragmenst hordoznak (lásd 2. példa) a Lac⁺ fenotípus stabil öröklődésére vizsgáltuk X-gal lemezekon. A stabilan öröklődő plazmidok egyikéről úgy találtuk, hogy mind par A, mind par B területet tartalmaz. Ez a plazmid, a pOU2, 24 kb méretű és fenotípusa a következő: Cm^R, Lac⁺, Par A⁺, Par B⁺.

A plazmidot az 1. példában leírtak szerint restrikciós enzimekkel feltérképeztük (lásd 4. ábra). A restrikciós térképből kitű-

nik, hogy egy Pst I fragmens törölve van az EcoRI-A fragmensből.

A plazmidot befogadó sejteket X-gal lemezekon 100 generáción át szelekciós kényszer nélkül növesztettük, és ilyen módon meghatároztuk, hogy a pOU2 stabilan öröklődik kevesebb, mint 10⁻⁶/sejt/generáció LF értékkel, ellentétben a pJL 124-el, amely 0,5-1%/sejt/generáció gyakorisággal eltűnik a sejtekből.

Az E. coli CSH 50/pOU2 törzset 2713. számmal helyeztük letétbe a DSM gyűjteményben.

3.) pMB1 replikon

A pF 1403-11 (lásd 2. táblázat) a pBR 322-nek (amely egy pMB1-replikon) egy nem stabilan öröklődő származéka, amely egy F plazmidból származó gén és a lac operon közötti fúziót hordoz. A plazmid Ap^R, Lac⁺ fenotípust közvetít. Az EcoRI-A : : Tn 5 fragmenst, amely a pOU 1-plazmidból (1. példa) származik, beiktattuk a pF1403-11 plazmid egyetlen EcoRI helyére közvetlenül a génfúzióval ellentétes irányban, ligáltuk és az E. coli CSH 50 törzsbe transzformáltuk, 50 µg amplicillint tartalmazó lemezekon Ap^R-re szelektálva, 50 µg/ml kanamicint tartalmazó lemezekon Km^R-re szelektálva és McConkey indikátor lemezekon Lac⁺-ra szelektálva.

Az így létrejött pOU10 plazmidot az 1. példa szerint leírt módszerrel restrikciós enzimekkel feltérképeztük (lásd 5. ábra), és az EcoRI-A : : Tn 5 fragmens beiktatását igazoltuk. A plazmid 34 kb méretű és fenotípusa a következő: Km^R, Ap^R, Lac⁺, Par A⁺, Par B⁺.

A plazmidot a 3. példa 1. részében leírt módszerrel stabil öröklődésre megvizsgáltuk. Ilyen módon demonstráltuk, hogy a pOU 10 stabilan öröklődik kevesebb, mint 10⁻⁶/sejt/generáció LF-értékkel, míg a pF 1403-11 6 · 10⁻³/generáció gyakorisággal tűnik el a sejtekből.

Az E. coli CSH 50/pOU10 törzset 2714 számmal helyeztük letétbe a DSM gyűjteményben.

4. példa

Az EcoRI-A fragmensből származó Pst I fragmens klónozása, amely stabilizálja a pJL 124-et.

Az EcoRI-A fragmenst egy sor restrikciós enzimmel hasítottuk, és az így nyert fizikai térképet az 1. ábrán mutatjuk be. Amint látható, a fragmens több Pst I fragmensből tevődik össze. Abból a célból, hogy csökkentjük a Par⁺ fenotípust közvetítő fragmens méretét, megkíséreltük szubklónozni a pJL124 átvizsgáló vektorban a par területet, amelyeket valószínűleg egy vagy több Pst I fragmens hordoz (lásd 2. példa). Több korrekt fenotípusú - vagyis Lac⁻

McConkey laktóz lemezen és stabil öröklődés szelekciós kényszer távollétében - klón elemzése azt mutatja, hogy a Pst I-D fragmens (lásd 1. ábra) közvetíti ezt a fenotípust. Más Pst I fragmens egyedül nem volt képes stabilizálni a pJL 124-et. A pJL 124 stabilizálásért felelős területet, amely egy 1,8 kb-s Pst I fragmens belül helyezkedik el, par B-vel jelöljük.

Abból a célból, hogy tovább elemezzük a Pst I-D fragmenst, a fragmenst egy pBR 322 plazmid bla-génjében levő egyedüli Pst I helyre klónoztuk, amely a pOU 93-at eredményezi (lásd 7. ábra; a plazmidot 2724 számmal helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben). Ennek a plazmidnak a restriktív térképezése azt mutatja, hogy a Pst I-D fragmens három Rsa I helyet tartalmaz (lásd 6. ábra). Az Rsa I tompa végeket alakít ki, ezért a 900 bp-s Rsa I fragmenst a következő módon iktattuk be a PHP34 plazmid (Prentki és munkatársai: Gene, 17, 1982, 189-96 oldal) Sma I helyére. pOU 93-at hasítottunk Rsa I-el, és összekevertük Sma I-el hasított PHP 34-el, majd ligáltuk. A ligációs keveréket olyan E. coli CSH 50 törzsbe transzformáltuk, amely már befogadott pOU 94 plazmidot (ez egy p15 származék, amely fenotípusa szerint Lac⁻ és Par B⁺; lásd 8. ábra, ezt a plazmidot 2725 számmal helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben), ampicillin rezisztenciára szelektálva 50 µg/ml ampicillint tartalmazó lemezekon.

A különböző plazmidokban hordozott par B⁺ területek által kifejezett összeférhetetlenség következtében a pOU 94 elvész, amikor egy másik plazmidot, amely Par B⁺ fenotípusú, bevezetünk az E. coli sejtbe, így lehetővé válik, hogy a helyes beiktatásokra és transzformációkra a sejteket McConkey lemezre szélesztve és kiválogatva a szintelen telepeket (Lac⁻) szelektáljunk. Az egyik ilyen összeférhetetlen PHP 34 plazmidszármazékot, amelyről azt találtuk, hogy tartalmazza a 900 bp-s Rsa I fragmenst, pOU 13-al jelöltük. A plazmid 5,3 kb méretű és fenotípusa a következő: Tc^R, Ap^R, Par B⁺.

A plazmidot az 1. példában leírtak szerint restriktív enzimekkel feltérképeztük (9. ábra). A térképezés azt mutatja, hogy az Rsa I fragmens átalakult egy 900 bp-s EcoRI fragmenssé, mivel a PHP34 Sma I helyét a két EcoRI hely szegélyezi.

Az E. coli CSH 50/pOU 13 törzset 2716 számmal helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

A pOU13-ból származó 900 bp-s EcoRI fragmenst beiktattuk a pOU101 EcoRI helyére, amely egy Ap^R, Cm^R „megvaduló” mini-R1 származék (a pOU101 konstrukciójának részletes leírása megtalálható a bejelentőknek a jelen bejelentéssel összefüggő bejelentésében, amelynek címe: Plazmidok feltételes szabályozatlan replikációs viselkedéssel; és amelyet ugyanazon a napon nyújtottak be,

5 mint a jelen bejelentést) egy egyedi EcoRI helyel a cat génben (ez a gén kódolja a Cm^R-t), így alkottuk meg a pOU14 plazmidot, amely 8,2 kb méretű és fenotípusa a következő: Cm^S, Ap^R, Par B⁺.

A plazmidot az 1. példában leírt módszer szerint restriktív enzimekkel feltérképeztük (lásd 10. ábra).

A plazmidot stabil öröklődésre megvizsgáltuk a 3.1. példában leírtak szerint, így demonstráltuk, hogy 30 °C hőmérsékleten a pOU14 stabilan öröklődik kisebb, mint $1 \cdot 10^{-4}$ /sejt/generáció LF értékkel, ugyanakkor a pOU101 1%/generáció gyakorisággal elvész a sejtekből.

Az E. coli CSH 50/pOU14 törzset 2717. számmal helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

5. példa

Mini-R1 plazmidok stabilizálása par B fragmenssel

25 pOU 90 plazmidot - amely a pKN 1562 „megvaduló” replikációs származéka, és amely az R1 plazmid alapreplikóját, az ED₄ fágól származó λ Pa promotort és cl₈₇ represszort, a β -laktamáz kódoló gént a Tn 3 transzpozonból, valamint a pKN184-ből származó EcoRI-A fragmenst tartalmazza, úgy állítottuk elő, hogy a pOU82-t (DSM 2482) EcoRI-gyal hasítottuk, és ezen a helyen a pKN184 vad típusú par területét tartalmazó EcoRI-A fragmenst iktattuk bele, majd ligáltuk. A pOU90-t Sal I-el elhasítottunk, és ligáltunk a pOU61 plazmidot nyerve. A plazmidot E. coli CSH 50 törzsbe transzformáltuk, McConkey lemezekon Lac⁻ fenotípusra szelektálva.

30 A pOU61-et az 1. példában leírt módszerrel feltérképeztük (lásd 11. ábra). A restriktív térképből kitűnik, hogy a pOU61 hordozza az Eco RI-A fragmens jobb oldali végét, amely a par B területet tartalmazza. A plazmid mérete 10 kb és fenotípusa a következő: Par B⁺, Ap^R, Lac⁻.

40 A plazmidot a 3.1. példában leírtak szerint stabil öröklődésre vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a pOU61 stabilan öröklődik kevesebb, mint $1 \cdot 10^{-4}$ /sejt/generáció LF értékkel.

55 Az E. coli CSH 50/pOU61 törzset 2723 számmal helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

6. példa

A pF 1403-11 plazmid stabilizálása a par B fragmenssel

60 A pOU1 plazmidot (lásd 1. példa) Sal I-el hasítottuk, és összekevertük pF 1403-11 plazmiddal, amelyet előzőleg Sal I-el elhasi-

tottunk, majd ligáltuk, és *E. coli* CSH 50 törzsbe transzformáltuk ampicillin rezisztens telepekre szelektálva McConkey laktóz indikátorlemezeken. Néhányat ezek közül a Lac⁺ klónok közül a Lac⁺ fenotípus stabil öröklődésére McConkey lemezeken átvizsgáltunk, ahogyan ezt az Anyagok és módszerek fejezetben leírtuk.

A stabilan öröklődő plazmidokat az 1. példában leírtak szerint restriktációs enzimekkel feltérképeztük (lásd 12. ábra). A restriktációs térképből kitűnik, hogy ezek a pOU1-nek azt a Sal I fragmensét hordozzák, amelyen a par B terület elhelyezkedik. A pF 1403-11-et és a pOU1-ből származó Sal I 15 fragmenst tartalmazó plazmidot pOU 12-nek neveztük. Ennek mérete 16 kb és fenotípusa a következő: Par B⁺, Lac⁺, Ap^R. A pOU 12 stabilan öröklődik kevesebb, mint $5 \cdot 10^{-5}$ /sejt/generáció LF értékkel.

Az *E. coli* CSH 50/pOU12 törzset 2715 számon helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

7. példa

A p15 plazmid stabilizálása par A fragmenssel

PMC 903 plazmidot (Casadaban és munkatársai: *J. Bact.* 143, 1980, 971. oldal) hasítottunk EcoRI-el, és a pOU43 plazmidból (13. ábra; 2720. DSM szám) származó, a par A területet hordozó EcoRI fragmenst iktattuk bele, majd ligáltuk, és az *E. coli* CSH 50 törzsbe transzformáltuk. Az így létrejött plazmidot pOU 45-nek jelöltük, ennek mérete 13,4 kb és fenotípusa a következő: Par A⁺, Lac⁻, Ap^R, Km^R.

A plazmidot az 1. példában leírtak szerint restriktációs enzimekkel feltérképeztük (lásd 14. ábra). A restriktációs térképekből kitűnik, hogy a par A terület beiktatózott a lac operonba, amely ez által inaktiválódott.

Amikor az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon stabilitásra vizsgáltunk, a plazmidot stabilan öröklődőnek találtuk $8 \cdot 10^{-4}$ /sejt/generáció LF értékkel, míg a PMC 903 LF értéke 1%/sejt/generáció.

Az *E. coli* CSH 50/pOU45 törzset 2721 számmal helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

8. példa

Mini-R1 plazmid stabilizálása par A területtel

A pOU43-ból származó EcoRI fragmenst beiktattuk a pOU82 mini-R1 plazmidba (DSM száma 2482), amely tartalmazza az R1 plazmid alap-replikonját, az EdA4-fágból eredő λ Pa promotort és cl represszor gént, a β -laktamáz kódoló gént a Tn 3 transzpozonból, a pVH 1424-ből a deo-promotort és a lac Z gén

amino-terminális végét, továbbá a pSKS 104-ből a lac operon maradványát (a pOU82 konstrukciójának részletes leírása megtalálható a bejelentőknek a jelen bejelentéssel összefüggő bejelentésével, amelynek címe: Plazmidok feltételeken szabályozatlan replikációs viselkedéssel; és amelyet ugyanazon a napon nyújtottak be, mint a jelen bejelentést). A pOU82 plazmid hordozza az Ap^R és Lac⁺ fenotípust és van egy egyedi EcoRI helye, amely használható az EcoRI fragmensek klónozásához. Ez a plazmid 1%/generáció frekvenciával vész el szelektációs kényszer távollétében.

A plazmidot, amelyben 2,4 kb-s EcoRI fragmenst iktattunk be azonos orientációban, pOU47-nek jelöltük. A plazmid mérete 14 kb és fenotípusa a következő: Par A⁺, Lac⁺, Ap^R.

A pOU47-et az 1. példában leírtak szerint restriktációs enzimekkel feltérképeztük (lásd 15. ábra).

Az *E. coli* CSH 50/pOU47 törzset 2722 számon helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

A par A területet hordozó EcoRI fragmenst tovább csökkentettük 400 bp-vel a Bal 31 exonukleáz segítségével; a törlést az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak alapján hajtottuk végre, pOU47 egyedüli BamHI helyét hasznosítva. Az így megalkotott plazmidot pOU472-vel jelöltük. A plazmid 13 kb méretű és fenotípusa a következő: Par A⁺, Lac⁺, Ap^R.

A pOU472-t az 1. példában leírtak szerint restriktációs enzimekkel feltérképeztük (lásd 16. ábra). A restriktációs térképből kitűnik, hogy a pOU472 hordozza a Bal 31 deléció által létrehozott 2,0 kb-s EcoRI fragmenst.

Amikor az Anyagok és módszerek fejezet szerint stabilitásra vizsgáltunk, a plazmidot stabilan öröklődőnek találtuk, amely azt jelenti, hogy a teljes par A területet tartalmazza a 2,0 kb nagyságú EcoRI fragmens.

Az *E. coli* CSH 50/pOU472 törzset 2726 számon helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

9. példa

par A területet hordozó mini R1 plazmid létrehozása

pOU 90 plazmidot (lásd 5. példa) BamHI-vel és részlegesen Sau 3A-val elhasítottuk, hogy kitöröltük az EcoRI-A fragmens egy részét, a nagyobb 6 kb-s rész visszamaradt, majd ligáltuk. Az így nyert pOU91 plazmidot *E. coli* CSH 50 törzsbe transzformáltuk. A pOU 91 mérete 18,75 kb, fenotípusa a következő: Par⁺, Ap^R, Lac⁺. A plazmidot az 1. példában leírtak szerint restriktációs enzimekkel feltérképeztük (17. ábra).

A plazmid stabilitását úgy határoztuk meg, hogy pOU 91-et tartalmazó sejteket (és kontrollként a pOU 82-t tartalmazó sejteket) McConkey lemezeken, szelekciós kényszer nélkül, 30 °C hőmérsékleten 25 generáción át növesztettünk; a pOU 91-el transzformált sejtek vörös telepeket képeznek (Lac⁺), míg a pOU 82-vel transzformált sejtek mind vörös, mind fehér telepeket képeznek, jelezve, hogy a szelekciómentes periódus során a pOU 82 elveszett jónéhány sejtől.

Az E. coli CSH/pOU91 törzset 2483. számon helyeztük letétbe a DSM törzsgyűjteményben.

10. példa

par A', par B' mini-R1 plazmid megalkotása

pOU 82 plazmidot (8. példa) hasítottunk EcoR1-el, és a pOU43-ból (lásd 7. példa és 13. ábra) származó, a par A területet hordozó EcoR1 fragmenst iktattuk bele. Ebből az EcoR1 fragmensből töröltünk legalább 500 bázispárt, beleértve egy EcoR1 helyet is, Bal 31 exonukleáz segítségével. A plazmid egyedüli EcoR1 helyére a pOU13-ból (lásd 4. példa és 9. ábra) származó EcoR1 fragmenst iktattuk be. A keletkezett plazmid, amely egy Par A', Par B' fenotípust hordoz, ezután transzformálható olyan E. coli CSH 50 törzsbe, amely már pOU94-et hordoz, és kiválogatható lényegileg ugyanolyan módszerrel, mint a 4. példában, azzal a különbséggel, hogy a pOU82 származék gyenge Lac⁺ fenotípust közvetít, ami azt jelenti, hogy az ezt a plazmidot befogadó sejtek telepei csak a közepesen lesznek vörösek és a szélén szinte teljesen, amikor McConkey laktóz-indikátor lemezeken nőnek.

11. példa

par A+, par B+ mini-R1-plazmid létrehozása

pOU61 plazmidot (lásd 5. példa) hasítottunk EcoR1-el, és a par A területet hordozó pOU43-ból eredő EcoR1 fragmenst iktattuk bele, majd ligáltuk. Az így nyert plazmidot, amely Par A', Par B' fenotípust közvetít, lehet azután transzformálni E. coli CSH 50 törzsbe, amely már hordoz pOU2 plazmidot, és ilyen módon lehet válogatni a 4. példában leírt módszer szerint. A kívánt plazmidot befogadó sejtek telepei szintelen telepekként (Lac⁻) mutatkoznak McConkey laktóz lemezeken.

Megjegyzés. A jelen leírásban és igénypontokban, ahol külön nem jelezzük a par⁻, Par⁻, par⁺ vagy Par⁺ jeleket, a par és Par kifejezés a megosztási funkció kifejeződését jelenti.

1. Eljárás örökletesen instabil plazmidok stabilizálására, azzal jellemezve, hogy a stabilizálandó plazmidba egy olyan DNS fragmentumot iktatunk be, amely magában foglalja az R1 plazmid EcoR1-A fragmentumát vagy annak egy rövidebb fragmentumát, amely egy R1 par területet tartalmaz. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R1 par A területet, R1 par B területet vagy R1 par A és R1 par B területet tartalmazó DNS fragmentumot alkalmazunk. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan, R1 par A és R1 par B területet tartalmazó DNS fragmentumot alkalmazunk, amelynek hossza legfeljebb 6 kb, előnyösen legfeljebb 4 kb, különösen legfeljebb 3 kb. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan, R1 par A területet tartalmazó DNS fragmentumot alkalmazunk, amelynek hossza legfeljebb 4 kb, előnyösen legfeljebb 2,5 kb, különösen legfeljebb 1 kb, (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan R1 par B területet tartalmazó DNS fragmentumot alkalmazunk, amelynek hossza legfeljebb 2 kb, előnyösen legfeljebb 1,5 kb, különösen legfeljebb 1 kb. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy plazmidként p15 plazmidot vagy egy származékát vagy egy nagy kópiaszámú, széles gazdaszervezet tartományú plazmidot vagy annak származékát alkalmazunk. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy plazmidként pMB1 plazmidot vagy annak származékát, előnyösen pBR322 plazmidot vagy annak származékát alkalmazunk. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy plazmidként IncFII összeférhetlenségi csoportba tartozó plazmidokat, beleértve az R1-et és származékait, F plazmidot vagy származékait vagy kis kópiaszámú, széles gazdaszervezet tartományú plazmidokat vagy származékaikat használjuk. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy plazmidként egy vagy több, a plazmiddal természet szerint nem-rokon gént tartalmazó plazmidot alkalmazunk. (Elsőségsége: 1982. 09. 16.)

10. Eljárás pOU1, pOU71-184, pOU2, pOU10, pOU13, pOU14, pOU61, pOU12, pOU45, pOU47 és pOU472 stabilizált plazmidok előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) pOU1 plazmid előállítására pKN184 plazmidot tartalmazó E. coli sejteket b211 : : Tn5 bakteriofág szuszpenzióval fertőzünk, és

a kanamicin rezisztenciát (Km^R) és ParA⁺, ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

b) pOU71-184 plazmid előállítására pOU71 plazmidot EcoR1 enzimmel kezelünk, a pOU1 EcoR1-A : : Tn5 fragmensét beiktatjuk, majd ligálás után E. coliba transzformáljuk, és a Km^R-t és ParA⁺, ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

c) pOU2 plazmid előállítására pJL124 plazmidot PstI enzimmel kezelünk, PstI enzimmel részlegesen emésztett pKN184 plazmiddal keverjük, ligáljuk és E. coliba transzformáljuk, és a ParA⁺, ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

d) pOU10 plazmid előállítására a pOU1 plazmid EcoR1-A : : Tn5 fragmensét pF1403-11 plazmid EcoR1 helyére iktatjuk be, majd E. coliba transzformáljuk, és a ParA⁺, ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

e) pOU13 plazmid előállítására EcoR1-A fragmentum PstI-D fragmentumát pBR322 PstI helyére iktatjuk be, a kapott pOU93 plazmidot RsaI enzimmel kezeljük, az RsaI fragmentumot, amely a parB területet hordozza, a pHP34 plazmid SmaI helyére beiktatjuk, majd E. coliba transzformáljuk, és a ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

f) pOU14 plazmid előállítására pOU13 plazmidot EcoR1 enzimmel kezelünk, a pOU13 plazmid EcoR1 fragmentumát, amely a parB területet hordozza, pOU101 plazmid EcoR1 helyére iktatjuk be, majd E. coliba transzformáljuk és a ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

g) pOU61 plazmid előállítására pKN184 plazmid EcoR1-A fragmentumát pOU90 plazmidba iktatjuk be, SalI-gyel kezeljük, ligáljuk, és a ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

h) pOU13 plazmid előállítására pOU1 plazmidot SalI-gyel kezelünk, SalI-gyel kezelt pF1403-11 plazmiddal keverjük, ligáljuk, és E. coliba transzformáljuk, és a ParB⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

i) pOU45 plazmid előállítására pMC903 plazmidot EcoR1-gyel kezelünk, pOU43 plazmid EcoR1 fragmentumát, amely a parA területet hordozza, iktatjuk be, ligáljuk és E. coliba transzformáljuk, majd a ParA⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

j) pOU47 plazmid előállítására pOU43 EcoR1 fragmentumát pOU82 plazmid EcoR1 helyére iktatjuk be, E. coliba transzformáljuk és a ParA⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk,

k) pOU472 plazmid előállítására pOU47 EcoR1 fragmentumát, amely a parA területet hordozza, 400 bp-vel csökkentjük Bal31 exonukleáz segítségével, E. coliba transzformáljuk és a ParA⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk. (Elsőbbsége: 1983. 09. 09.)

11. Eljárás pOU91 stabilizált plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy pOU90

plazmidot BamHI-gyel és részlegesen Sau3A-val hasítjuk, ligáljuk és E. coliba transzformáljuk és a ParA⁺ fenotípust közvetítő plazmidokat kiválasztjuk. (Elsőbbsége: 1982. 09. 24.)

12 Eljárás stabilizált plazmidot befogadó Gram-negatív baktériumok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely Gram-negatív baktérium törzsbe valamely, az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti módon előállított plazmidot transzformálunk. (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.)

13. Eljárás stabilizált plazmidot befogadó Gram-negatív baktérium előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely Gram-negatív baktérium törzsbe valamely, a 10. igénypont szerinti módon előállított plazmidot transzformálunk. (Elsőbbsége: 1983. 09. 09.)

14. Eljárás stabilizált plazmidot befogadó Gram-negatív baktérium előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely Gram-negatív baktérium törzsbe egy, a 11. igénypont szerinti módon előállított plazmidot transzformálunk. (Elsőbbsége: 1982. 09. 24.)

15. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Gram-negatív baktériumként E. coli törzset alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.)

16. Eljárás plazmid DNS géntermékének előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított plazmidba egy vagy több, a plazmiddal természetes módon nem kapcsolatos gént iktatunk be, az ezt a plazmidot tartalmazó Gram-negatív baktériumot tenyésztjük, és kívánt esetben a génterméket kinyerjük. (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.)

17. Eljárás plazmid DNS géntermék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 10. igénypont szerinti eljárással előállított plazmidba egy vagy több, a plazmiddal természetes módon nem kapcsolatos gént iktatunk be, az ezt a plazmidot tartalmazó Gram-negatív baktériumot tenyésztjük, és kívánt esetben a génterméket kinyerjük. (Elsőbbsége: 1983. 09. 09.)

18. Eljárás plazmid DNS géntermék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 11. igénypont szerinti eljárással előállított plazmidba egy vagy több, a plazmiddal természetes módon nem kapcsolatos gént iktatunk be, az ezt a plazmidot tartalmazó Gram-negatív baktériumot tenyésztjük, és kívánt esetben a génterméket kinyerjük. (Elsőbbsége: 1982. 09. 24.)

19. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tenyésztést legalább 100 baktériumgeneráción át folytatjuk. (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.)

20. Eljárás egy par terület egy plazmidba történő korrekciójának beiktatásának szelektálására, *azzal jellemezve*, hogy egy feltételezetten beiktatott par területet hordozó plazmidot olyan baktériumba transzformálunk, amely egy másik, nem-rokon, azonos par te-

rületet, valamint egy megfelelő tápközegben felismerhető fenotípust közvetítő plazmidot hordoz, a transzformált baktériumot ezen a megfelelő tápközegen növesztjük, és a par terület korrekcióját ennek a fenotípusnak az elvesztésével azonosítjuk. (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.) 5

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy felismerhető fenotípusként egy antibiotikum rezisztenciát alkalmazunk.* (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.) 10

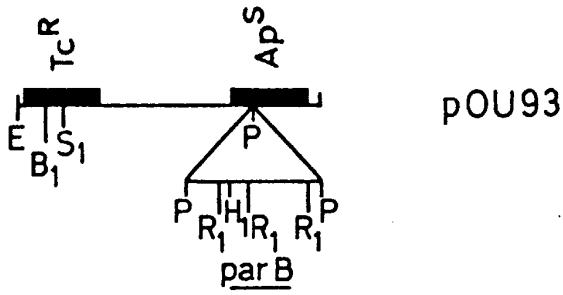
22. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy felismerhető fenotípusként Lac⁻-t alkalmazunk.* (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.) 15

23. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy az említett másik plazmidon levő par területként parA területet alkalmazunk.* (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.)

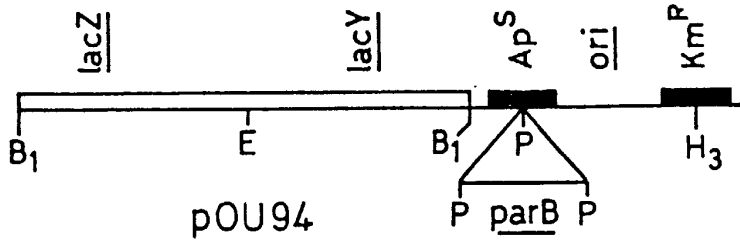
24. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy az említett másik plazmidon levő par területként parB területet alkalmazunk.* (Elsőbbsége: 1982. 09. 16.) 20

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest -
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
R 4965 - KJK

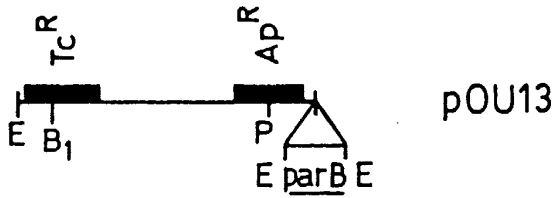
90.3461.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató



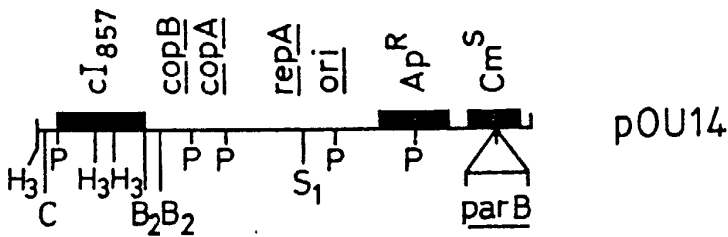
7. ábra



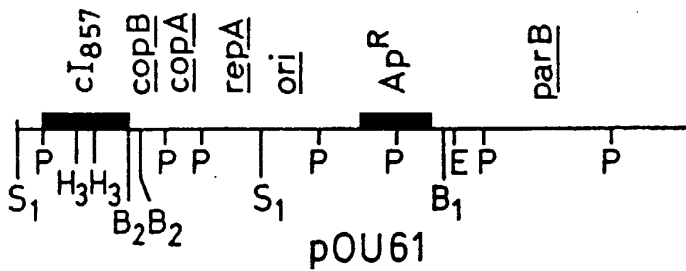
8. ábra



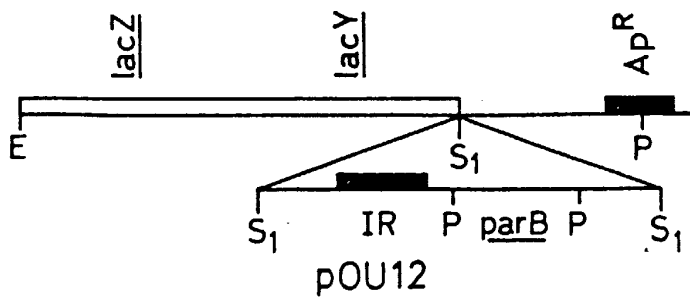
9. ábra



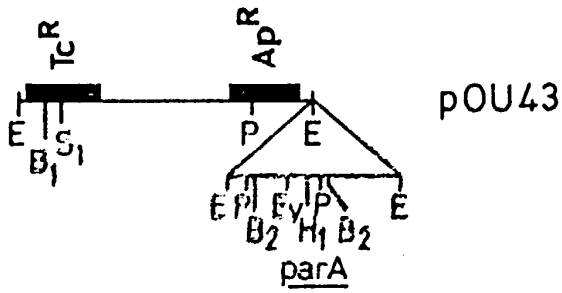
10. ábra



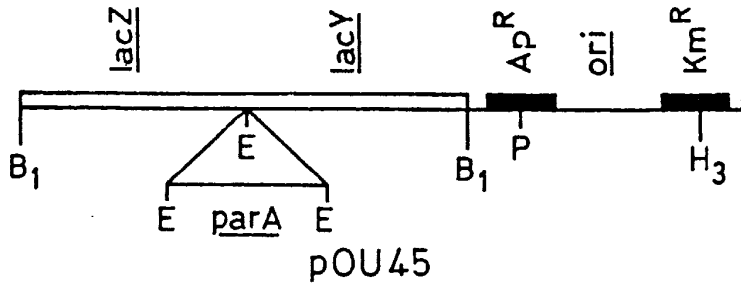
11. ábra



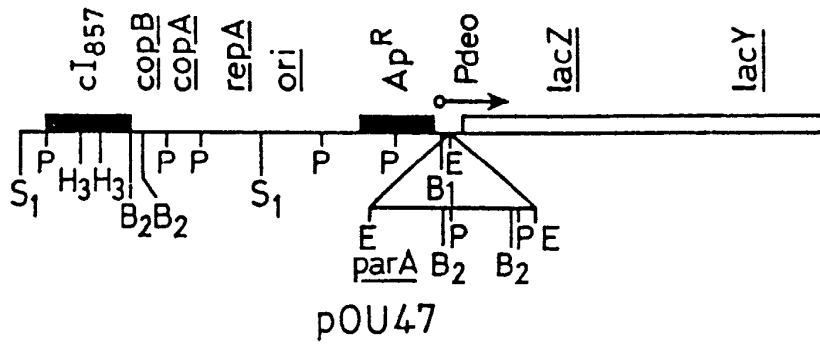
12. ábra



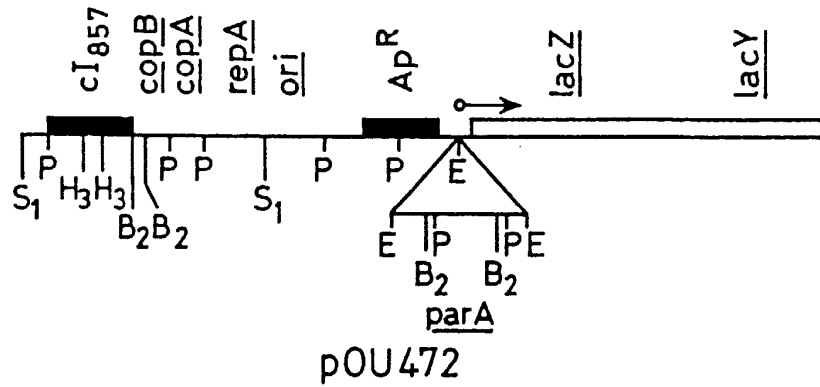
13. ábra



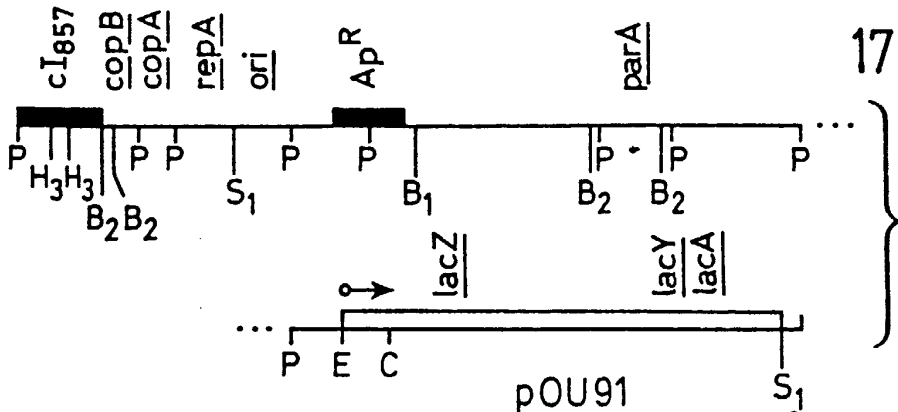
14. ábra



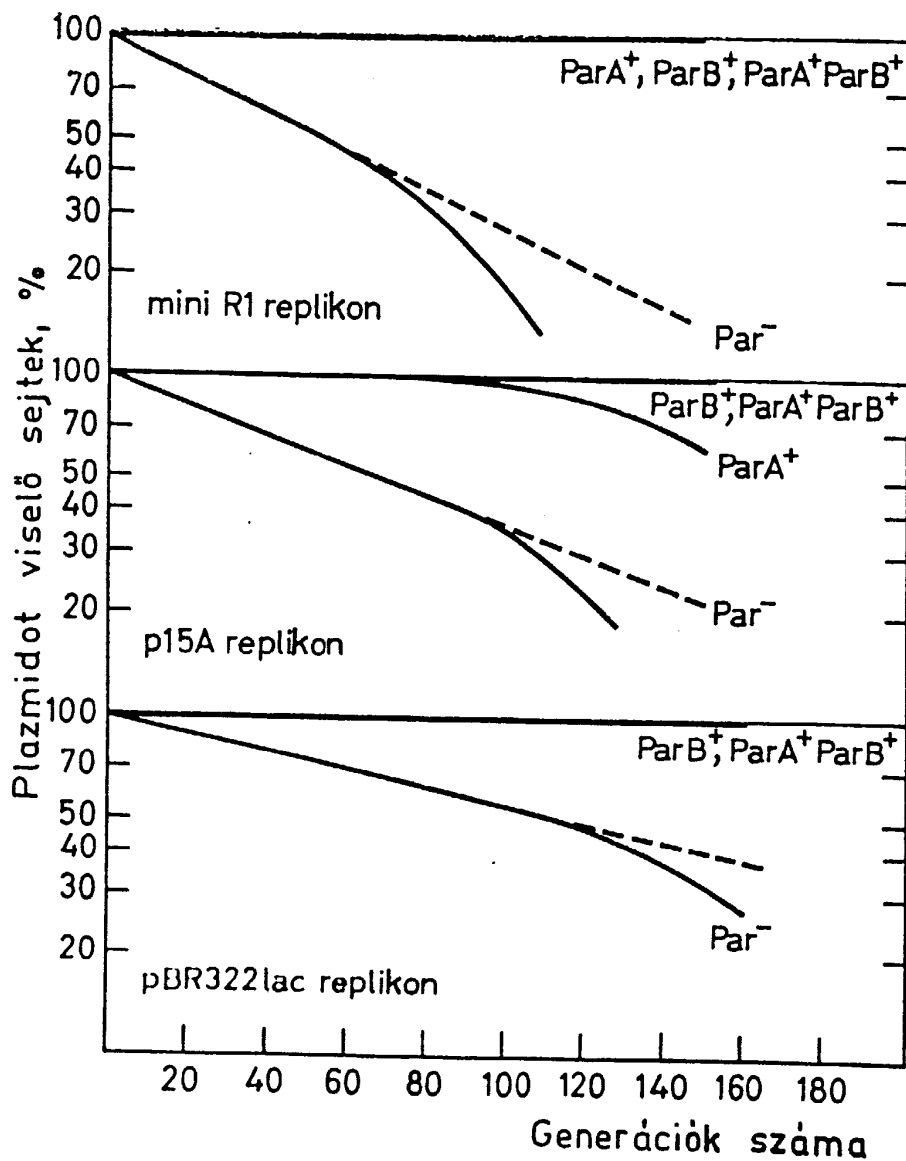
15. ábra



16. ábra



17. ábra



18.ábra