

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
MIKROBIOLOGIJOS IR BIOTECHNOLOGIJOS KATEDRA

Mikrobiologijos studijų programos II kurso studentė
Reda Rimavičiūtė

OriC* vektorių kūrimas *M. gallinarum

Baigiamasis magistro darbas

Darbo vadovai: dr. Rolandas Meškys
dr. Irena Dumalakienė

Darbas atliktas Biochemijos instituto
Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje bei
Inovatyvios medicinos centro Individualizuotos imunoterapijos
technologijų kūrimo skyriuje

2011
Vilnius

OriC* vektorių kūrimas *M. gallinarum

Studentė Reda Rimavičiūtė _____

Darbo vadovai Dr. Rolandas Meškys _____

Dr. Irena Dumalakienė _____

PADĖKA

Esu dėkinga savo darbo vadovams dr. Rolandui Meškiui ir dr. Irenai Dumalakienei, kurie negailėdami laiko ir pastangų padėjo ruošiant šį darbą. Taip pat dėkoju Ritai Meškienei, Ritai Vilienei ir visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos bei Individualizuotos imunoterapijos technologijų kūrimo skyrių darbuotojams bei studentams už patarimus ir sukurtą malonią darbo atmosferą.

TURINYS

TURINYS	4
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	6
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. Mikoplazmų sistematika	8
1.2. Mikoplazmų ekologinė niša.....	8
1.3. Bendros mikoplazmų savybės.....	10
1.3.1. Genomo dydis ir sudėtis.....	10
1.3.2. Ekstrachromosominė DNR	10
1.3.3. Baltymų sintezė.....	12
1.3.4. DNR replikacija	13
1.3.5. Genetinė rekombinacija	15
1.4. Mikoplazmos kaip modeliniai organizmai.....	17
1.5. Priemonės mikoplazmoms tirti	19
1.5.1. Heterologinė mikoplazmų genų ekspresija	19
1.5.2. Transpozonai.....	19
1.5.3. Plazmidės	21
1.5.4. Transformacija	22
1.6. <i>Mycoplasma gallinarum</i>	23
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	25
2.1. Bakterijos ir plazmidės	25
2.2. Reagentai.....	25
2.3. Terpės ir auginimo sąlygos	26
2.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	26
2.5. PGR naudoti pradmenys	26
2.6. DNR fragmento skyrimas iš agarozinio gelio.....	27
2.7. DNR ligavimas.....	27
2.8. Kompetentinių <i>E.coli</i> ląstelių ruošimas ir elektroporacija.....	27
2.9. Plazmidžių išskyrimas	28
2.10. DNR elektroforezė	29
2.11. DNR veikimas restrikcijos endonukleazėmis	29
2.12. <i>M. gallinarum</i> elektroporacija.....	29
2.13. Cheminė <i>M. gallinarum</i> transformacija	29
2.14. Genominės DNR išskyrimas.....	30
2.15. PGR produkto gryninimas	31
2.16. Hibridizacijos zondo žymėjimas biotinu	31
2.17. Hibridizacijos zondo žymėjimas digoksigeninu	31
2.18. Šarminis DNR perkėlimas ant membranos.....	31
2.19. Neutralus DNR perkėlimas ant membranos	32
3. REZULTATAI.....	33
3.1. <i>OriC</i> srities klonavimas	33
3.2. Žymens įterpimas.....	37
3.3. <i>M. gallinarum</i> transformacija	42

3.4. <i>M. gallinarum</i> transformantų kultivavimas	44
3.5. Vektoriaus nustatymas <i>M. gallinarum</i> transformantuose	47
4. REZULTATŲ APTARIMAS	53
IŠVADOS	56
Santrauka.....	57
Summary	58
LITERATŪROS SĄRAŠAS	59

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

EDTA – N,N,N',N'-etilendiaminotetraacto rūgštis

SDS – natrio dodecilsulfatas

PEG – polietileno glikolis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

KVF – kolonijas formuojantys vienetai

IVADAS

Mikoplazmų genomo tyrimai aktualūs, nes šie mikroorganizmai sukelia daugelį žmonių ir gyvūnų ligų. Be to, dėl unikalių genomo ypatybių mikoplazmos yra svarbūs modeliniai organizmai. Deja, jų tyrimus stabdo genetinių įrankių trūkumas. Pastaruoju metu imta kurti savaime besireplikuojančius vektorius pasinaudojant tų mikoplazmų, kurių genomo seka jau nustatyta, chromosomos replikacijos pradžios sritimi (*oriC*). Vektoriai, turintys šią sritį, įvesti į ląsteles autonomiškai replikuojasi ir gali būti panaudoti genų raiškai bei inaktyvavimui. Dėl to, kad net artimų mikoplazmų rūšių *oriC* srityse DNR sekos labai skiriasi, tokie vektoriai paprastai replikuojasi tik toje rūšyje, kurios *oriC* sritis įeina į jų sudėtį. Tad kiekvienai mikoplazmų rūšiai tinkamus vektorius reikia konstruoti atskirai.

Mycoplasma gallinarum yra itin platų šeimininkų ratą turinti rūšis. O kadangi jos patogeninis potencialas silpnas, būtų labai tinkama kaip modelinis organizmas šeimininkų kolonizavimo mechanizmams išsiaiškinti. Tačiau bet kokiems detalesniems šios bakterijos tyrimams yra reikalingas vektorius. Šio darbo tikslas ir buvo sukonstruoti *M. gallinarum* ląstelėse savaime besireplikuojantį *oriC* vektorių. Tam reikėjo klonuoti *oriC* sritį iš *M. gallinarum* chromosomos, pasirinkti ir įterpti į vektorių geną-žymenį, sukurtus vektorius įvesti į iki tol netransformuotas *M. gallinarum* ląsteles ir nustatyti jų stabilumą.

Darbas atliktas Biochemijos institute, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje, bei Inovatyvios medicinos centre, Individualizuotos imunoterapijos technologijų kūrimo skyriuje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mikoplazmų sistematika

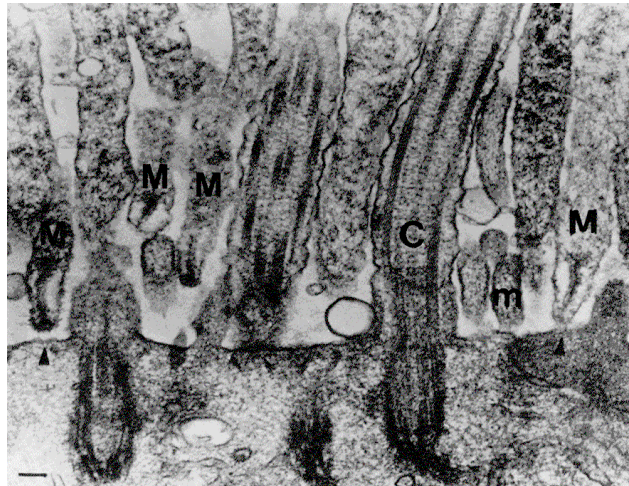
Nuo kitų prokariotų mikoplazmas skiria tai, kad jos neturi ląstelės sienelės. Kadangi sienelė laikoma esmine bakterinės ląstelės sudedamąja dalimi, mikoplazmos yra išskiriamos į atskirą taksonominę grupę – klasę *Mollicutes*. Šiai klasei priklauso penki būriai: *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Haloplasmatales* ir *Mycoplasmatales*. *Acholeplasmatales* ir *Haloplasmatales* būriuose yra tik po vieną gentį, atitinkamai, *Acholeplasma* ir *Haloplasma*. *Anaeroplasmatales* būriui priklauso *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Erysipelothrix*, *Holdmania* ir *Solobacterium* gentys. *Entomoplasmatales* būriui priskiriamos *Entomoplasma*, *Mesoplasma* ir *Spiroplasma* gentys. O pačiame didžiausiame *Mycoplasmatales* būryje yra *Mycoplasma* gentis, kuriai šiuo metu priklauso 131 rūšis, ir *Ureaplasma* gentis, teturinti aštuonias rūšis (Ludwig ir kt., 2011). Visi *Mollicutes* klasės atstovai yra vadinami bendru mikoplazmų vardu nepaisant to, ar priklauso *Mycoplasma* genčiai. Tik augalų parazitai dar gali būti vadinami fitoplazmomis. Be to, tradicijomis pagrįstoje šių mikroorganizmų klasifikacijoje rūšis priskiriama *Mycoplasma* genčiai, jei turi stuburinį šeimininką. Tačiau atlikus molekulinis tyrimus paaiškėjo, kad toks skirstymas ne visada atspindi filogenetinius organizmų ryšius. Pavyzdžiui, paaiškėjo, kad *Mycoplasma mycoides* ir *Mycoplasma capricolum* rūšys yra artimesnės *Spiroplasma* genties atstovams negu kitiems *Mycoplasma* atstovams. Tačiau tam, kad nesukeltų sumaišties medicinoje ir agrobiologijoje, klasifikacija nekeičiama (Wolf ir kt., 2004).

1.2. Mikoplazmų ekologinė niša

Visų žinomų rūšių mikoplazmos yra priklausomos nuo eukariotinių ląstelių – šeimininkių. *Acholeplasma*, *Mycoplasma* ir *Ureaplasma* genčių atstovai dažniausiai infekuoja žinduolius bei paukščius ir yra siejami su daugeliu lėtinių kvėpavimo, urogenitalinių takų ir artritinių susirgimų. Dauguma yra prisitaikę prisikabinti prie gyvūninių ląstelių paviršiaus, nors yra ir invazinių rūšių. *Anaeroplasma* ir *Asteroplasma* gentys sudaro dalį galvijų ir avių mikrofloros. Iš kitų mikoplazmų genčių jos išsiskiria griežtu anaerobiškumu. *Spiroplasma* genties atstovai sukelia augalų ir vabzdžių ligas. Tarp jų

šeimininkų yra didelę ekonominę reikšmę turinčių augalų, tokių kaip kukurūzai ar citrinmedžiai. Kai kurios rūšys yra patogeniškos ir žinduoliams (Miles, 1992).

Tačiau mikoplazmų patogeniškumą buvo sunku įrodyti. Visų pirma, jų virulentiškumo determinantės yra sudėtingos ir skiriasi nuo tipiškų patogeninių bakterijų. Antra, daugelis mikoplazmų rūšių yra sveikų individų mikrofloros dalis ir jų ryšys su ligomis komplikuoja diagnozę. Be to, mikoplazmos gali ne tik pačios sukelti ūmias arba lėtines ligas daugelyje organizmo vietų su įvairiomis komplikacijomis, bet ir būti kitų ligų sudedamieji veiksniai. Dėl visų šių priežasčių mikoplazmų pripažinimas ligas sukeliančiomis bakterijomis užtruko. Pirmieji pranešimai apie tai, kad mikoplazmos infekuoja žmones, pasirodė tik 7-ajame praėjusio amžiaus dešimtmetyje. Tuo metu įrodyta, kad vienintelė su agliutininu susijusios pirminės atipinės pneumonijos priežastis yra *Mycoplasma pneumoniae*. Jau kuris laikas buvo žinoma, kad šios ligos sukėlėjas yra itin mažas, nes praeina pro bakterijas sulaikančius filtrus, ir yra atsparus penicilinui. Tačiau manyta, kad tai virusas, o į klinikiniuose mėginiuose aptinkamas mikoplazmas nebuvo žvelgiama rimtai, nes mikoplazmų dažniausiai randama ir sveikų žmonių mėginiuose. Panaši situacija kartojosi ir kitų šios grupės bakterijų sukeltamų ligų tyrimuose – ne iš karto patikėta, kad susirgimą sukelia „tik mikoplazmos“ (Baseman ir Tully, 1997).



1.1 pav. Peršviečiamuoju elektroniniu mikroskopu daryta žiurkėno trachėjos žiedo, infekuoto *M. pneumoniae*, nuotrauka. M – mikoplazma, m – mikrogaurėlis, C – blakstienėlė (Baseman ir Tully, 1997).

1.3. Bendros mikoplazmų savybės

1.3.1. Genomo dydis ir sudėtis

Mikoplazmų genomas pasižymi dviem neįprastomis savybėmis. Visų pirma, jis labai mažas. Dvigrandinė žiedinė mikoplazmų DNR yra sudaryta vos iš 600–1800 kilobazių (1.1 lentelė). Ypač stebėtina tai, kad nepaisant tokio mažo genetinės medžiagos kiekio, mikoplazmos yra sėkmingi patogenai. Be to, daugumai rūšių būdingos po chromosomą pasklidusios pasikartojančios sekos. Tai ne rRNR genų kopijos, nes kitaip negu kitos bakterijos, turinčios po 5–10 šių genų kopijų, mikoplazmos jų turi tik 1 ar 2 (Amikam ir kt., 1984). Dauguma pasikartojančių sekų yra IS elementai, o kitos – homologiškos pagrindinius paviršiaus antigenus koduojantiems genams, tad greičiausiai yra reikalingos su antigenine variacija susijusiems DNR persitvarkymams.

Antra neįprasta mikoplazmų genomo savybė yra itin žemas G + C sąstatas. Daugumos rūšių jis mažesnis nei 35 %, o kelioms būdingas net 25 % (1.1 lentelė). Tarpgeninės sritys paprastai yra turtingesnės A-T (dažniausiai ~ 90 % A + T) negu koduojančios sritys. Šia prasme *Mycoplasma pneumoniae* yra išskirtinė mikoplazma, nes jos genome G + C sąstatas yra maždaug 40 %. Netrukus turėtų būti išaiškinta, ar ši rūšis turi aktyvesnę uracilo-DNR glikozilazę. Šis fermentas šalina uracilo liekanas, atsiradusias DNR arba spontaninio citozino deaminavimo metu, arba dėl klaidingo dUTP įterpimo DNR replikacijos metu. Nepakankamas uracilo-DNR glikozilazės aktyvumas lemtų palaišni G + C bazių porų pakeitimą A + T poromis. Ir iš tiesų, kai kuriose iš tirtų mikoplazmų šio fermento aktyvumas silpnas (Williams ir Pollack, 1990).

1.3.2. Ekstrachromosominė DNR

Ekstrachromosominiai DNR elementai mikoplazmose aptinkami retai. Išimtis yra *Spiroplasma* genties rūšys, kuriose buvo identifikuota ir plazmidžių, ir bakteriofagų genomų (Breton ir kt., 2008). Bakteriofagai yra kur kas dažniau pasitaikantys ir būdingi daugeliui genčių, o plazmidžių kol kas rasta tik *Spiroplasma citri* ir *Mycoplasma mycoides* rūšyse (Dybvig ir Voelker, 1996). Bakteriofagų, infekuojančių mikoplazmas, genomai yra nuo 4 iki 40 kilobazių dydžio, žiediniai arba linijiniai, viengrandiniai arba dvigrandiniai. Be to, jų

genetinė medžiaga dažniausiai yra ne RNR, o DNR. Todėl kyla pavojus tokį bakteriofagą supainioti su plazmide (Dybvig ir Voelker, 1996).

1.1 lentelė. Kai kurių mikoplazmų genomo rodikliai.

Organizmas	Genomo dydis (bp)	G + C sąstatas (%)	Genų skaičius	Šeimininkas
<i>Acholeplasma</i>				
<i>laidlawii</i>	1496992	32	1422	gyvūnai
<i>Mesoplasma</i>				
<i>florum</i>	793224	28	717	augalai, vabzdžiai
<i>Mycoplasma</i>				
<i>agalactiae</i>	877438	29	792	gyvūnai
<i>alligatoris</i>	973030	26	843	aligatoriai, kaimanai
<i>arthritidis</i>	820453	31	671	graužikai
<i>bovis</i>	1003404	29	868	karvės
<i>capricolum</i>	1010023	23	867	ožkos
<i>crocodyli</i>	934379	26	763	krokodilai
<i>fermentans</i>	977524	26	866	žmonės
<i>gallisepticum</i>	1012800	31	817	paukščiai
<i>genitalium</i>	580076	31	524	žmonės
<i>hominis</i>	665445	27	577	žmonės
<i>hyopneumoniae</i>	892758	28	727	kiaulės
<i>hyorhinis</i>	839615	25	707	kiaulės
<i>mobile</i>	777079	24	667	žuvys
<i>mycoides</i>	1211703	23	1053	karvės, ožkos
<i>synoviae</i>	799476	28	715	paukščiai
<i>pneumoniae</i>	816394	40	733	žmonės
<i>pulmonis</i>	963879	26	815	graužikai
<i>Ureaplasma</i>				
<i>parvum</i>	751679	25	647	žmonės
<i>uralyticum</i>	874478	25	695	žmonės

M. mycoides plazmidės pADB201 ir pKMK1, vienintelės žinomos *Mycoplasma* genties plazmidės, yra mažos (~ 2 kb) ir koduoja tik plazmidės replikacijai ir palaikymui reikalingus veiksnius (Bergemann ir kt., 1989; King ir Dybvig, 1992). Iš jų nukleotidų sekos galima spręsti, kad abi yra susijusios su didele gram-teigiamųjų bakterijų plazmidžių šeima (Gruss ir Ehrlich, 1989).

1.3.3. Baltymų sintezė

Genų raiškos signalai mikoplazmose primena gram-teigiamųjų bakterijų. Promotoriai dažniausiai turi –10 (Pribnovo dėžutė) ir –35 regionus, artimus gram-teigiamųjų bakterijų konsensuso sekoms, kurias atpažįsta sigma veiksnys σ^A . Žinoma, kad mikoplazmos neturi alternatyvių sigma veiksmių. Diferencijuota genų raiška įgyvendinama reguliaciniais baltymais. Pavyzdžiui, karščio šoko baltymų transkripcija yra valdoma HrcA slopikliui jungiantis prie CIRCA DNR elemento, esančio atitinkamų genų promotoriuose (Musatovova ir kt., 2006).

Mikoplazmos naudoja nukrypusį genetinis kodą. Kitaip negu įprasta, UGA kodonas koduoja triptofaną. Be to, jo dažnis genome yra iki dvidešimties kartų didesnis negu alternatyvaus triptofaną koduojančio UGG kodono. Tai galima paaiškinti evoliuciniu spaudimu dėl mažesnio G + C sąstato. Geno pradžia dažniausiai žymi AUG kodonas, tačiau yra ir alternatyvių – GUG bei UUG. Dar viena neįprasta kai kurių mikoplazmų savybė yra ta, kad CGG kodonas jose yra beprasmis. Jis nekoduoja jokios aminorūgšties, nėra ir STOP kodonas. Tiesa, tai būdinga tik *mycoides* klasteriui priklausančioms mikoplazmoms – *M. mycoides* ir *M. capricolum* (Westberg ir kt., 2004).

Dėl mažesnio G + C sąstato atsiradęs universalus genetinio kodo nuokrypis būdingas ne tik paskutinei kodono pozicijai, bet ir pirmoms dviems. Dėl to keičiasi mikoplazmų baltymų sudėtis. Palyginti su *Escherichia coli*, kurioje G + C sąstatas yra ~ 50 %, mikoplazmos turi mažiau GGN, CCN, GCN ir CGN kodonų. Todėl mikoplazmų baltymai turi mažiau glicino, prolino, alanino ir arginino aminorūgščių liekanų negu jų homologai *Escherichia coli*. Atitinkamai, dėl didesnio AAN, UUY, UAY ir AUN kodonų kiekio šiems organizmams būdingesnės asparagino, lizino, fenilalanino ir izoleucino aminorūgščių liekanos (Dybvig ir Voelker, 1996).

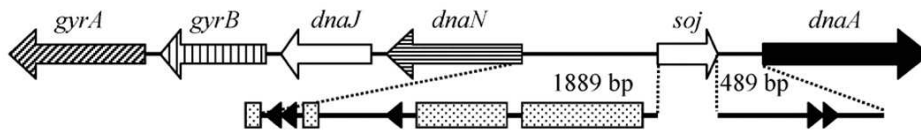
Daugumos mikoplazmų genų mRNR turi ribosomos tvirtinimosi sritį, panašią į gram-teigiamųjų bakterijų Shine-Dalgarno seką. Ji išsidėsčiusi 4–10 bazių porų prieš starto kodoną ir su ribosoma sąveikauja sudarydama vandenilinį ryšį 3' gale su 16 S rRNR. Gram-teigiamųjų bakterijų 16 S rRNR molekulė yra trimis nukleotidais ilgesnė negu gram-neigiamųjų. O mikoplazmų – keturiais nukleotidais ilgesnė negu gram-teigiamųjų ir net septyniais negu gram-neigiamųjų. Šie papildomi nukleotidai dalyvauja jungiantis su mRNR, todėl ryšys tarp dviejų RNR molekulių būna stipresnis. Tačiau tokiu atveju efektyviai transliacijai reikalinga ilgesnė ribosomos tvirtinimosi sritis. Dėl šios priežasties gali būti sudėtinga ekspresuoti gram-teigiamųjų ir ypač gram-neigiamųjų bakterijų genus mikoplazmose (Dybvig ir Voelker, 1996).

Kadangi mikoplazmų ląstelės neturi sienelės, jos neturi ir periplazminės ertmės. Tad baltymai, kurie nėra citoplazminiai, yra arba sekretuojami, arba membraniniai. Signalinių peptidų sekos, nukreipiančios baltymus lauk pro plazminę membraną, yra tipiškos eubakterijoms (von Heinje, 1990). Mikoplazmos turi neįprastai didelį lipoproteinų kiekį. Šie baltymai yra intensyviai tyrinėjami, nes atlieka svarbų vaidmenį infekcijos metu (Zuo ir kt., 2009). Žinoma, kad signalo peptidazei II nukirpus transportuojamo lipoproteino signalinį peptidą, už jo esantis cisteinas yra acilinamas. Kiti mikoplazmoms būdingi baltymų modifikavimo būdai yra fosforilinimas ir izoprenilinimas. Baltymų fosforilinimas būdingas už sąveiką su paviršiumi atsakingiems baltymams. Izoprenilinimas dažnas eukariotuose, o tarp bakterijų kol kas pastebėtas tik *Acholeplasma laidlawii*. Tokios modifikacijos mechanizmas ir funkcija kol kas nėra žinoma (Nystrom ir Wieslander, 1992).

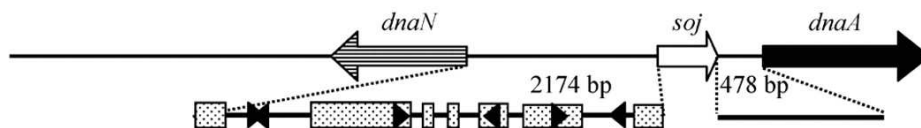
1.3.4. DNR replikacija

Daugumos bakterijų replikacijos pradžios sritis (*oriC*) yra šalia *dnaA* geno. Šio geno koduojamas baltymas DnaA yra transliacijos iniciatorius. Jis atpažįsta ir jungiasi prie specifinių sekų, vadinamų DnaA dėžutėmis. *Escherichia coli* DnaA dėžučių konsensuso seka yra TTATCCACA (Messer, 2002). Pasinaudojant šia seka buvo ieškoma *oriC* sričių tuose mikoplazmų genomuose, kurie jau sekvenuoti. DnaA dėžutės, kaip ir buvo galima tikėtis, buvo aptiktos netoli *dnaA* geno. Jų sekos ne idealiai atitiko *E. coli* konsensuso seką, tad buvo pasiūlyta konsensuso seka mikoplazmoms – TT(A/T)TC(C/A)ACA (Lee ir kt., 2008). Nustatyta visų tirtų rūšių *oriC* sričių struktūra (1.2 pav.).

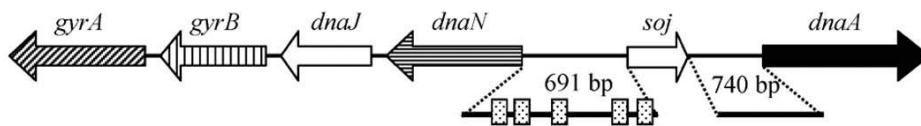
M. gallisepticum



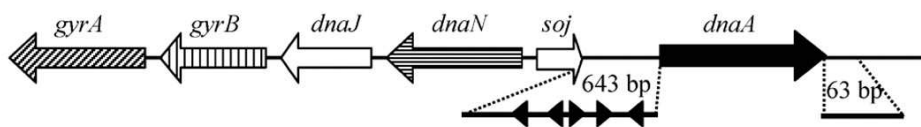
M. imitans



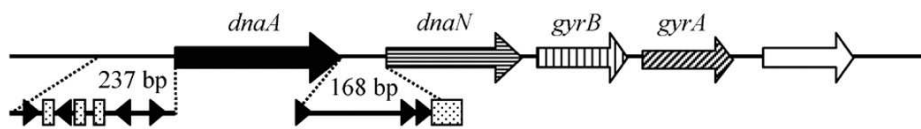
M. pneumoniae



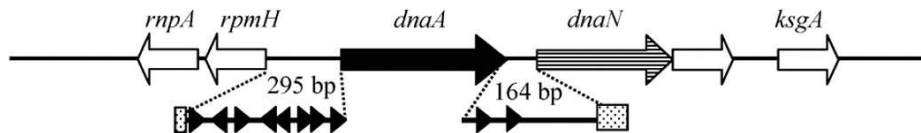
M. genitalium



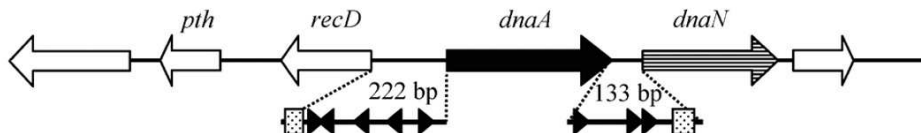
S. citri



M. capricolum



M. pulmonis



1.2 pav. Mikoplazmų *oriC* sričių struktūra. Trikampiai žymi DnaA dėžutes, o stačiakampiai – AT turtingus regionus (Lee ir kt., 2008).

Žvelgiant į nustatytas *oriC* sričių struktūras mikoplazmose, aiškiai matyti jų filogenetiniai ryšiai. *S. citri* ir *M. capricolum* priklauso Spiroplasma filogenetinei grupei. Abiejų rūšių *oriC* sritis driekiasi abipus *dnaA* geno, nes DnaA dėžutės išsidėsčiusios ir iš vienos, ir iš kitos pusės. Tiesa, tokia pati *oriC* struktūra yra ir *M. pulmonis*, priklausančios Hominis filogenetinei grupei. O 2011-aisiais nustatytas *M. fermentans*, *M. alligatoris* ir *M. crocodyli* genomų sekas paaiškėjo, kad šių bakterijų replikacijai reikalingos DnaA dėžutės taip pat išsidėsčiusios abipus *dnaA* geno. Pastarosios trys rūšys priskiriamos Fermentans filogenetinei grupei (Rechnitzer ir kt., 2011; Brown ir kt., 2011). *M. gallisepticum*, *M. imitans*, *M. pneumoniae* ir *M. genitalium* yra Pneumoniae filogenetinės grupės atstovės. Jų DnaA dėžutės išsidėsčiusios tik iš vienos *dnaA* geno pusės ir, išskyrus *M. genitalium*, supa *soj* geną. Iš eksperimentų kuriant besireplikuojantį vektorių su *M. genitalium oriC* sritimi paaiškėjo, kad kitapus *dnaA* geno esanti 63 bazių porų ilgio seka DNR replikacijai taip pat reikalinga. Įdomu tai, kad nors tarp vienos filogenetinės grupės narių genų tvarka yra konservatyvi, DNR seka smarkiai skiriasi. Pavyzdžiui, *M. gallisepticum* ir *M. pneumoniae* DnaA baltymo amino rūgščių sekos panašumas yra tik 23 % (Cordova ir kt., 2002).

Detaliau tiriant DNR replikaciją *M. capricolum* ląstelėse pastebėta, kad iniciacija vyksta ne tiksliai ties DnaA dėžutėmis. Nors *M. capricolum* ir šiaip būdingas didelis AT kiekis (74,5–75,9 %), iniciacijos vietoje jis siekia net 78,2 %. Greičiausiai replikacija šioje vietoje prasideda todėl, kad ties adenino ir timino poromis lengviau išskirti DNR grandines. Po iniciacijos replikacija tęsiasi abiem kryptimis kaip ir kitose bakterijose. *M. capricolum* replikacinės šakutės juda 6 kilobazių per minutę greičiu, t.y. dešimt kartų lėčiau negu *E. coli*. Su ląstelės mase DNR replikacija suderinama keičiant replikacijos iniciacijos dažnį (Miyata ir Seto, 1999).

1.3.5. Genetinė rekombinacija

Labiausiai stebinanti mikoplazmų savybė yra ta, kad nepaisant labai mažų genomų, jos sugeba įveikti organizmų šeiminių gynybos sistemas, efektyviai plisti ir ilgai išgyventi. Vienas iš mechanizmų, kuris galėtų paaiškinti, kaip šios bakterijos išsiverčia su tokio mažu genetinės medžiagos kiekiu, yra genų pertvarka. Dėl šio reiškinio minimalus nukleotidų kiekis gali koduoti dideles baltymų šeimas. Bakterijoms būdingi trys rekombinacijos tipai: homologinė, vietai specifinė ir nedėsningoji. Homologinė rekombinacija vyksta tarp

pakankamą panašumą turinčių nukleotidų sekų ir joje paprastai dalyvauja RecA baltymas. Vietai specifinei rekombinacijai reikalingi baltymai – rekombinazės, kurie atpažįsta specifines sekas. Nedėsninėjai rekombinacijai nereikalingi nei specialūs fermentai, nei tam tikros sekos, o rekombinuojančios sritys gali būti visai nehomologiškos.

Pirmąjį įrodymą, kad homologinė rekombinacija mikoplazmose vyksta, pateikė G. Mahairas ir F. Minion (Mahairas ir Minion, 1989). Jie tyrė mikroorganizmą, publikacijose pavadintą *Mycoplasma pulmonis*, tačiau vėliau jis buvo identifikuotas kaip *Acholeplasma* genties rūšis, panaši į *Acholeplasma oculi* (Artiushin ir kt., 1995). Šios mikoplazmos ląstelės buvo transformuotos plazmide, turinčia homologinį recipiento chromosomai fragmentą. Po transformacijos pavyko išskirti transformantus, kurie turėjo plazmidę, įsiintegrusią į chromosomą homologijos vietoje. Panašūs eksperimentai, įrodantys homologinės rekombinacijos buvimą, atlikti ir su kitomis mikoplazmų rūšimis, pavyzdžiui, *M. gallisepticum* (Cao ir kt., 1994). Homologinė rekombinacija mikoplazmose greičiausiai priklauso nuo RecA baltymo, nes kamienų, turinčių mutaciją šiame baltyme, nepavyksta transformuoti plazmide su homologiniu chromosomai fragmentu (Dybvig ir Woodard, 1992). Tačiau alternatyvūs homologinės rekombinacijos variantai turbūt taip pat egzistuoja, nes funkcionalaus RecA neturinčiame *Spiroplasma citri* kamienne homologinė rekombinacija buvo užfiksuota (Marais ir kt., 1996).

Pirmasis genetinės rekombinacijos pavyzdys mikoplazmose buvo vietai specifinė L2 viruso integracija į *Acholeplasma laidlawii* chromosomą (Dybvig ir Maniloff, 1983). Buvo identifikuotas atvirojo skaitymo rėmelis, koduojantis tikėtiną rekombinazę, artimą bakteriofago λ integrazei. Jau seniai žinoma ir vietai specifinė rekombinacija lizogeniniams bakteriofagams integruojantis į *Spiroplasma* genties bakterijas (Dickinson ir Townsend, 1985). *Mycoplasma* genties rūšyse bakteriofagai aptinkami retai ir yra menkai ištirti.

Kitas vietai specifinės rekombinacijos atvejis yra judrieji genomo elementai. Nors jie migruoja į atsitiktines genomo vietas, transpozicija yra vietai specifinė, nes fermentai, vykstantys perkėlimą, atpažįsta specifines sekas judriųjų elementų galuose. Geriausiai žinomi mikoplazmų judrieji genomo elementai yra gram-teigiamųjų bakterijų transpozonomai Tn916 ir Tn4001. Tn916 funkcionuoja tokiose nutolusiose rūšyse kaip *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma citri*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hominis* ir *Mycoplasma arthritidis*. Tn4001 transpozicija

užfiksuota *Acholeplasma* genties rūšyse, *Mycoplasma gallisepticum* ir *Mycoplasma pneumoniae*. Tačiau bandymai šį transpozoną įvesti į *Mycoplasma pulmonis* genomą buvo nesėkmingi (Dybvig ir Voelker, 1996).

Mikoplazmoms būdinga ir vietai specifinė DNR inversija. Šis procesas reguliuoja organizmo restrikcines ir modifikacines savybes bei lemia paviršiaus antigenų kaitą. Geriausiai ištirta *Mycoplasma pulmonis* vietai specifinė DNR inversija. Šios bakterijos V-1 paviršiaus antigenų sintezę lemia *vs*a lokusas. Jame yra septyni *vs*a genai, iš kurių vienu metu aktyvus būna tik vienas. Tas ekspresuojamas genas turi 5'-galo sritį, kurioje yra ribosomos tvirtinimosi vieta, ATG starto kodonas ir signalinis peptidas, būdingas prokariotų lipoproteinams. Nei vieno iš šių komponentų nėra neekspresuojamuose *vs*a genuose. Tad genų ekspresija reguliuojama perkeliant neaktyvaus geno 3'-galo regioną į iki tol aktyvaus geno 3'-galo regiono vietą. Visa ši pertvarka vyksta vietai specifinės DNR inversijos būdu tarp specifinių 34 kb sekų (Dybvig ir Voelker, 1996).

Nedėsningoji rekombinacija gali atsirasti arba dėl DNR grandinę nutraukiančių ir sujungiančių fermentų klaidų, arba dėl sutrikusios DNR replikacijos. Nedėsningosios rekombinacijos pavyzdys yra delecijos ar kitos pertvarkos, išstinkančios *Mycoplasma mycoides* pKMK1 plazmidę, kai ji perkeliama į *Acholeplasma laidlawii* (King ir Dybvig, 1993). Ši plazmidė replikuojasi besisukančio rato principu ir susidarančios viengrandinės DNR tarpinės formos stimuliuoja nedėsningąją rekombinaciją. Dažnai pasikartojantiems mikoplazmų paviršiaus baltymams būdinga dydžių įvairovė greičiausiai taip pat yra susijusi nedėsningąją rekombinacija.

1.4. Mikoplazmos kaip modeliniai organizmai

Jau pusšimtį metų žinoma, kad mikoplazmos sukelia ligas, ir tiriamas jų patogeniškumas. Tačiau paskutinį dešimtmetį atkreiptas dėmesys į ypač mažus jų genomus ir nutarta pasinaudoti šia ypatybe. Mokslininkai jau seniai bando išsiaiškinti, kiek ir kokių genų pakaktų ląstelės gyvybei palaikyti. Galimybė atsakyti į šį klausimą atsirado tik nustačius bakterinių genomų sekas. Kai tik paaiškėjo pirmųjų dviejų bakterijų, gram-neigiamosios *Haemophilus influenzae* ir gram-teigiamosios *Mycoplasma genitalium*, genomų sekos, A. Mushegian'as ir E. Koonin'as priėjo išvadą, kad minimalų genų rinkinį gyvybei palaikyti sudaro 256 joms bendri genai (Mushegian ir Koonin, 1996). Vėliau R. Gil ir kt. išanalizavę

keleto laisvai gyvenančių ir endosimbiotinių bakterijų genomus įvardino būtiną rinkinį iš 206 genų (Gil ir kt., 2004). Tačiau patikimesnis būdas išsiaiškinti minimalų genų rinkinį būtų ne lyginti skirtingų organizmų genomus, o remtis eksperimentiniais duomenimis. Mikoplazmos pasirinktos kaip modelis šiems eksperimentams.

Mikoplazmos yra labiausiai tinkami mikroorganizmai minimaliam genų rinkiniui nustatyti, nes jos evoliucionavo smarkiai redukuojantis genomui, tad jau dabar turi beveik minimalų genomą. Pavyzdžiui, *Mycoplasma genitalium* turi tik 482 baltymus koduojančius genus ir itin mažą ~580 kb genomą. Yra ir mažesnius genomus turinčių bakterijų, pavyzdžiui, *Carsonella ruddii* (~160 kb) ar *Nanoarchaeum equitans* (~491 kb), tačiau pastarosios yra endosimbiotinės ir nustatyti minimaliam genų rinkiniui, reikalingam laisvai gyvenančios ląstelės gyvybei palaikyti, netinka (Tamames ir kt., 2007; Waters ir kt., 2003). Įprastų didesnius genomus turinčių bakterijų 26% genų priklauso paralolinių genų šeimoms, o *M. genitalium* tokių genų turi tik 6%. Ši bakterija buvo panaudota transpozoninei mutagenezei. Po mutagenezės išgyvenusios ląstelės būdavo padauginamos ir atliekama inversinė PGR transpozono įsiterpimo vietai genome nustatyti. Tokiu būdu buvo identifikuoti nebūtini gyvybei palaikyti genai. Iš viso *M. genitalium* jų buvo rasta 100. Likę 387 baltymus koduojantys ir 43 RNR koduojantys genai yra būtini (Glass ir kt., 2006). Taigi eksperimentiniu būdu nustatytas minimalų genomą sudarančių genų skaičius yra beveik dvigubai didesnis už nustatytą lyginant skirtingų rūšių geno sekas.

Mikoplazmų geno mažumu buvo pasinaudota ir kituose tyrimuose. C. Lartigue ir kiti perkėlė visą nepažeistą *Mycoplasma mycoides* chromosomą į *Mycoplasma capricolum*, iš kurios buvo pašalinta jos chromosoma (Lartigue ir kt., 2007). Ląstelės recipientės, į kurias buvo perkeltas ląstelių donorių genomai, tapo fenotipiškai identiškoms ląstelėms donorėms. Taigi pavyko transplantuoti genomą vieną rūšį paverčiant kita. Vėliau buvo atliktas dar vienas reikšmingas eksperimentas panaudojant mikoplazmas – gautas pirmasis sintetinis genomai. D. Gibson ir kiti susintetino visą *Mycoplasma genitalium* genomą *de novo* ir klonavo jį į *Saccharomyces cerevisiae* (Gibson ir kt., 2008). Tai pavyko padaryti susintetinus ~ 50 bazių porų ilgio tarpusavyje persidengiančius oligonukleotidus, juos sujungus į 5–7 kilobazių ilgio kasetes, kurios tarpusavyje buvo jungiamos homologinės rekombinacijos būdu.

1.5. Priemonės mikoplazmoms tirti

1.5.1. Heterologinė mikoplazmų genų ekspresija

Didėjant susidomėjimui mikoplazmomis kaip modeliniais organizmais bei neslopstant poreikiui tirti jų patogeniškumą, išaugo gentinių įrankių, reikalingų šių organizmų tyrimams, poreikis. Susidurta su keletu pagrindinių problemų. Visų pirma, mikoplazmų baltymų biocheminei analizei reikalinga efektyvi jų ekspresija kitose ląstelėse-šeimininkėse, tačiau tam trukdo UGA kodonas, koduojantis triptofaną. Buvo pasiūlyta keletas sprendimų, pavyzdžiui, naudoti UGA supresuojančius *Escherichia coli* kamienus arba *Spiroplasma citri*, kuri UGA taip pat atpažįsta kaip triptofano kodoną (Smiley ir Minion, 1993; Stamburski ir kt., 1991). Jei gene UGA kodonų tik keletas, įmanoma juos pakeisti ir mutagenezės būdu (Robino ir kt., 2005). Vis dėlto pastarasis metodas atima daug laiko ir yra brangus, ypač esant daugiau UGA kodonų.

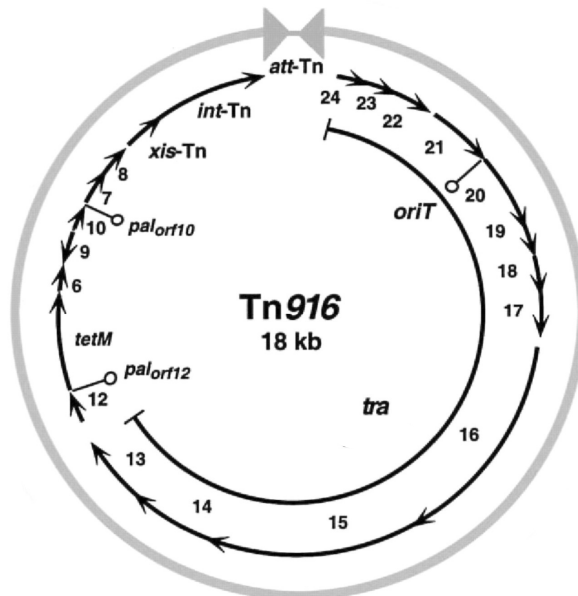
Patogiausias būdas išspręsti UGA kodonų problemai yra daugybinių mutacijų reakcija (Hames ir kt., 2005). Ji pagrįsta jungtinės grandininės reakcijos principu (Bi ir Stambrook, 1997). 5'-gale fosforilinti nukleotidai, turintys pageidaujamas mutacijas, įdedami į polimerazės grandininės reakcijos mišinį. Elongacijos metu ilginami įprasti pradmenys. Kadangi pradmenys su mutacijomis yra sukurti taip, kad prie taikinių hibridizuojasi stipriau, pailginti įprasti pradmenys gali būti liguojami prie jų 5' galo naudojant termostabilią DNR ligazę. Gaunama DNR grandinė su norima mutacija. Tokiu būdu pavyko pakeisti devynis UGA kodonus UGG kodonais *Mycoplasma pneumoniae* *glpK* gene (Hames ir kt., 2005).

1.5.2. Transpozonai

Kita problema, su kuria susiduriama mikoplazmų tyrimuose, yra vektorių trūkumas. Dauguma jų yra pritaikyti plačiai naudojamiems mikroorganizmams, tokiems kaip *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis*, tačiau netinka mikoplazmoms. Išimtis yra transpozonai, kurių šeimininkų ratas yra labai platus. Kaip jau minėta, Tn916 ir Tn4001, išskirti, atitinkamai, iš *Enterococcus faecalis* bei *Staphylococcus aureus*, gali būti naudojami mikoplazmose. Jie buvo pritaikyti ir genams suardyti, ir integruoti genetinę medžiagą į chromosomą (Dybvig ir Voelker, 1996).

Tn916 yra 18 kilobazių ilgio judrusis elementas, sudarytas iš *xis-Tn/int-Tn* genų išsikirpimui/integravimuisi, atsparumo tetraciklinui geno *tetM* ir *tra* genų, reikalingų pernašai

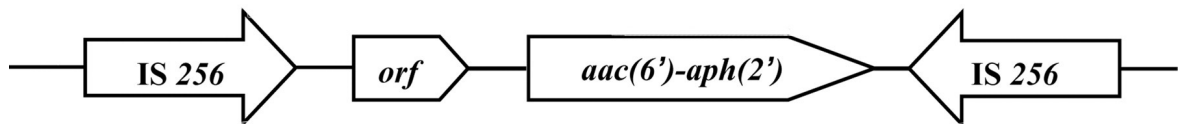
tarp ląstelių (1.3 pav.). Jo galuose yra atvirkštinės pasikartojančios sekos, kuriose sutampa 20 iš 26 nukleotidų (Courvalin ir Trieu-Cuot, 2001). Integravimosi srityje Tn916 nesukelia duplikacijų. Jam išsikerpant, vienas trūkis susidaro transpozono gale, o kitas – už šešių bazių porų komplementarioje DNR grandinėje. Šitai susidaro šešių bazių porų ilgio viengrandinės DNR iškyša. Po išsikirpimo transpozonas suformuoja žiedinę struktūrą su nesuporuotu šešių bazių porų ilgio heterodupleksu. Toks pats heterodupleksas susidaro ir išsikirpimo vietoje, tačiau jis paprastai ištaisomas replikacijos arba reparacijos metu. Tn916 integravimasis yra atvirkščias procesas susidarant šešių bazių porų ilgio heteroduplekso jungtims integravimosi srityje. Šis transpozonas integruojasi ne atsitiktinai, o karštuose taškuose, tad įsotinimo mutagenizei yra nelabai tinkamas (Halbedel ir Stulke, 2007).



1.3 pav. Transpozono Tn916 schema (modifikuota pagal Courvalin ir Trieu-Cuot, 2001).

Tn4001 yra 4,5 kilobazių ilgio transpozonas, sudarytas iš dviejų identiškų IS256 elementų, supančių *aac-aphD* geną, kuris lemia atsparumą gentamicinui, kanamicinui ir tobramicinui (1.4 pav.). Jam integruojantis taikinio vietoje DNR perskeliama taip, kad susidaro aštuonių bazių porų iškyšos. Po integracijos jos tampa dvigrandės, tad susidaro aštuonių bazių porų taikinio DNR duplikacijos (Chow ir kt., 2007). Kad transpozono stabilumas būtų didesnis, buvo sukurti mini-transpozonai. Jų transpozazės genas yra išorėje,

tad išvengiama pakartotinio transpozono išsikirpimo. Be to, buvo įvesti atsparumo tetraciklinui bei chloramfenikoliui genai bei restrikcijos vietos, kad galima būtų įterpti pageidaujamą genetinę medžiagą (Halbedel ir Stulke, 2007).



1.4 pav. Transpozono Tn4001 schema (modifikuota pagal Chow ir kt., 2007).

1.5.3. Plazmidės

Autonomiškai besireplikuojančios plazmidės yra labiau tinkamos genetiniams tyrimams negu transpozonai. Pastarieji į genomą integruojasi atsitiktinai, todėl netinka tikslingam genų suardymui, kuriam reikalinga homologinė rekombinacija tarp chromosominių ir ekstrachromosominių elementų. Tačiau plazmidės, kaip jau minėta, retai aptinkamos *Mycoplasma* gentyje. Tik *Mycoplasma mycoides* rasta kriptinių plazmidžių. Viena iš jų, pKMK1, yra 1875 bazių porų ilgio ir koduoja tik plazmidės replikacijai bei palaikymui reikalingus veiksnius (King ir Dybvig, 1992). Jos pagrindu buvo pabandyta sukurti vektorius, įterpiančią *Escherichia coli* replikacijos pradžios sritį ir atsparumo antibiotikams geną. Dauguma sukurtų darinių perkelti į mikoplazmas praradavo *E. coli* replikacijos pradžios sritį, tačiau vienas vektorius su atsparumo eritromicinui genu išliko stabilus *M. mycoides* ląstelėse daugybę persėjimų, tad yra tinkamas perkelti genetinei medžiagai į *M. mycoides* ir kai kurias kitas šios genties rūšis (King ir Dybvig, 1994).

Trūkstant natūralių plazmidžių mikoplazmose, teko kurti dirbtines. Tačiau tam reikėjo sulaukti, kol bus nustatytos genomų sekos ir paaiškės chromosomų replikacijos pradžios sričių sekos (*oriC*). Pirmieji tokį vektorių sukonstravo C. Cordova ir kiti panaudodami *Mycoplasma pulmonis oriC* sritį, kurią sudarė iš *dnaA* genas, apsuptas DnaA dėžučių (Cordova ir kt., 2002). Ši plazmidė turėjo ir *E. coli* replikacijos pradžios sritį, todėl klonavimas galėjo būti atliekamas šioje bakterijoje. Plazmidė replikavosi *M. pulmonis*, tačiau po keleto persėjimų homologinės rekombinacijos būdu integravosi į chromosomą *oriC* sityje.

Stabilumui padidinti *dnaA* genas buvo pakeistas atsparumo tetraciklinui genu *tetM*. Taip modifikuota plazmidė išliko stabili iki penkiolikto persėjimo (Cordova ir kt., 2002). Panašios *oriC* plazmidės buvo sukurtos ir *M. mycoides*, *M. capricolum*, *M. agalactiae*, *M. gallisepticum* bei *M. imitans* (Lartigue ir kt., 2003; Chopra-Dewasthaly ir kt., 2005; Lee ir kt., 2008). Visais atvejais homologinės rekombinacijos į *oriC* sritį dažnį pavyko sumažinti sutrumpinant *oriC* fragmentą.

Vos sukūrus pirmąsias *oriC* plazmidės, buvo patikrintas jų funkcionalumas heterologinėse replikacijos sistemose. Kai kuriais atvejais plazmidės su vienos rūšies *oriC* sritimi replikuodavosi ir kitose rūšyse. Paprastai tai būdavo labai artimos rūšys, nors pasitaikydavo ir išimčių. Pavyzdžiui, *M. capricolum* pavyko sėkmingai transformuoti ne tik jai artimos rūšies *M. mycoides oriC* plazmide, bet ir *Spiroplasma citri oriC* plazmide (Lartigue ir kt., 2003). Šių plazmidžių replikacija *M. capricolum* yra vienas iš retų pavyzdžių, kai plazmidės yra suderinamos tarp kelių genčių atstovų. Anksčiau heterologinė *oriC* plazmidžių, iš *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio harveyi* ir *Erwinia carotovora* transformacija buvo sėkminga *E. coli*. Vis dėlto svarbu paminėti, kad šių filogenetiškai tolimų rūšių 250 bp *oriC* sričių DnaA dėžutės yra labai konservatyvios. O *S. citri* ir *M. capricolum* atitinkamų sekų konservatyvumas yra labai mažas. Neįprastą *M. capricolum* sugebėjimą replikuoti kitų rūšių *oriC* plazmidės galėtų paaiškinti šiai rūšiai būdinga stipri DnaA baltymo raiška. Galbūt DnaA dėžučių konservatyvumo stoka yra kompensuojama didesnio DnaA baltymo kiekio (Lartigue ir kt., 2003). Vis dėlto keli sėkmingi atvejai pritaikant vienos rūšies *oriC* plazmidės kitoms yra labiau išimtis negu taisyklė. Dažniausiai kiekvienai rūšiai reikia sukurti naują stabiliai besireplikuojančią plazmidę su jos pačios *oriC* sritimi.

1.5.4. Transformacija

Transformacija yra vienintelis būdas įvesti vektorių į ląstelę mikoplazmose. Žinoma, kad šiuose mikroorganizmuose vyksta ir konjugacija, tačiau mechanizmas neaiškus, be to, ji būdinga ne visoms rūšims. Transdukcija taip pat dar nebuvo atlikta, nors keletas mikoplazmas infekuojamų virusų aptikta. O grynos DNR iš aplinkos be cheminės arba elektrinių laukų pagalbos mikoplazmos taip pat negali pasiimti. Taigi lieka transformacija,

kuri gali būti trejopa: cheminė transformacija su kalcio chloridu arba polietileno glikoliu (PEG), transformacija su į liposomas supakuota DNR ir elektroporacija.

Galėtų atrodyti, kad mikoplazmas transformuoti yra paprasta, mat jos neturi sienelės ir vektoriui tereikia įveikti fosfolipidinį dvisluoksnį. Tačiau iš tikrųjų jų transformacijos efektyvumas yra itin mažas, o kai kuriose rūšyse transformacija visai nepavyksta. Šiuos sunkumus tikriausiai sukelia mikoplazmoms būdingos su membrana susijusios nukleazės (Minion ir kt., 1993). Buvo pabandyta transformacijos metu paveikti *Mycoplasma gallisepticum* bei *Acholeplasma oculi* proteazėmis, tačiau transformacijos efektyvumo tai nepadidino (Minion ir Kapke, 1998).

Transformacijos efektyvumui itin svarbi yra kultūros augimo fazė. Dažniausiai geriausiai transformuojamos vidutinėje *log* fazėje esančios kultūros, tačiau būtinas ir didelis ląstelių kiekis transformacijos mišinyje. Vektoriaus kiekis taip pat turėtų būti didelis, paprastai geriausių rezultatų pasiekama naudojant 1–10 µg DNR. Taigi vektoriaus kiekio transformacijos mišinyje nepakanka, jį pirmiausia reikia padauginti kitose ląstelėse-šeimininkėse. Visos sąlygos turėtų būti iš naujo nustatomos kiekvienos rūšies atveju. Pavyzdžiui, praplovimas šaltu kalcio chloridu cheminės transformacijos metu vienoms rūšims smarkiai padidina išeigą, o kitoms atvirkščiai – sumažina (Minion ir Kapke, 1998). Be abejo, transformacijos būdas taip pat turėtų būti parenkamas kiekvienam atvejui atskirai. Pavyzdžiui, *Mycoplasma pneumoniae* žūva paveikta polietileno glikoliu, tad šias ląsteles įmanoma transformuoti tik elektroporacijos būdu (Hedreyda ir kt., 1993).

1.6. *Mycoplasma gallinarum*

Mycoplasma gallinarum yra dažniausia iš paukščių išskiriama mikoplazmų rūšis (Bencina ir kt., 1987). Tačiau jos šeimininkų ratas labai platus – ši rūšis gyvena ir kiaulėse, avyse bei galvijuose (Leigh ir Evans, 2009). Įprastu atveju *M. gallinarum* nesukelia ligos ir nėra laikoma patogeniška rūšimi. Tačiau kartu su bronchito virusu arba jo vakcina gali lemti oro maišų uždegimo išsivystymą (Shah-Majid, 1996). Imuninis atsakas į šią bakteriją yra labai silpnas, o susidarančių imunoglobulinų IgG ir IgM kiekis beveik nepastebimas (Bencina ir kt., 1991).

Dėl mažo patogeninio potencialo *M. gallinarum* kol kas nesulaukė didelio tyrėjų dėmesio, tad apie šią rūšį nedaug kas žinoma. Tačiau dėl neįprastos mikoplazmoms savybės

– itin plataus šeimininkų rato – kyla minčių pasinaudoti ja kaip modeliniu organizmu išsiaiškinti mechanizmus, kuriais naudojasi mikoplazmos kolonizuodamos šeimininko organizmą (Wan ir kt., 2004). Būtų svarbu nustatyti ir koku būdu *M. gallinarum* veikia kaip kofaktorius paukščių bronchito virusui. Tačiau bet kokiems detalesniems tyrimams reikalingi įrankiai, kuriais būtų galima tirti genų veiklą. Kaip jau minėta, labiausiai pravartu turėti autonomiškai besireplikuojantį vektorių. Mikoplazmoms naudojamos *oriC* plazmidės, tačiau jos pasižymi rūšiniu specifiškumu, tad jau sukurtos kitoms rūšims plazmidės nėra tinkamos *M. gallinarum*. Kad šios bakterijos tolesni tyrimai būtų įmanomi, reikia sukonstruoti jai pritaiktą vektorių, pasinaudojant chromosomine *oriC* seka.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Bakterijos ir plazmidės

Darbe buvo naudotas *Escherichia coli* DH5 α kamienas [ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYargF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) sup E44 *thr1 gyr A96 relA1*] (*Pharmacia*, Lenkija), *Mycoplasma gallinarum* lauko izoliatas (Vysniauskis ir kt., 2010), plazmidiniai vektoriai pTZ18R (Mead et al., 1986), pUC19 ir pTZ57R/T (*Fermentas*, Lietuva) bei p34S-Tc (Dennis ir Zylstra, 1998).

2.2. Reagentai

Restrikcijos ir ligavimo fermentai, ir jų buferiai, proteinazė K, Gene RulerTM DNR žymuo, IPTG, X-gal, DNR žymėjimo biotinu sistema (Biotin DecaLabel DNA Labeling KitTM) ir biotino chromogeninės detekcijos sistema (Biotin Chromogenic Detection KitTM) – „Fermentas“, Lietuva.

Digoksigenu žymėtas DNR žymuo, PGR produktų gryninimo rinkinys, DNR žymėjimo digoksigenu ir digoksigenino detekcijos sistema (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit IITM), plovimo ir blokavimo buferių rinkinys digoksigenino detekcijos sistemai – „Roche“, Vokietija.

Amonio acetatas, kalio acetatas, talio acetatas, Tris-HCl, Tris-OH, EDTA, SDS – „Sigma“, JAV.

Chloroformas, lizocimas, CaCl₂, KH₂PO₄, NH₄Cl, Na₂HPO₄ – „Reachim“, Rusija.

BBLTM mikoplazmų augimo terpė (*Frey*), mielių ekstraktas – „BD“, JAV.

Cisteino hidrochloridas, redukuotas β -NADH – „Acros Organics“, Belgija.

Platinum® Taq DNR polimerazė ir jos buferis – „Invitrogen“, JAV.

Agarozė, etidžio bromidas – „Serva“, Vokietija.

DNR gryninimo rinkinys (QIAmp DNA Stool Mini KitTM) – „Qiagen“, Vokietija.

Nailoninė membrana (Amersham HybondTM – N+)- „Amersham“, Švedija.

Etanolis – „Vilniaus degtinė“, Lietuva.

NB (nutrient broth) – „Oxoid“, Didžioji Britanija.

Pradmenys – „METABION“, Vokietija.

2.3. Terpės ir auginimo sąlygos

NA terpė: 28 g NA, 1 l H₂O.

Modifikuota Frey terpė: 2 % buljono pagrindo (BBLTM Mycoplasma broth base (Frey)), 15 % inaktyvuoto kiaulių serumo, 2,5 % mielių ekstrakto, 1 % gliukozės, 0,01 % cisteino hidroklorido, 0,01 % redukuoto β-NADH, 50 TV/ml penicilino G, 0,01 % talio acetato, 0,002 % fenolio raudonojo, pH 7,8.

Visos terpės buvo autoklavuojamos 30 min. 121 °C temperatūroje.

Escherichia coli bakterijos skystoje NB terpėje buvo auginamos 30 °C temperatūroje per naktį aeruojant, o ant agarizuotos terpės – 37 °C termostate.

Mycoplasma gallinarum ląstelės skystoje modifikuotoje Frey terpėje buvo auginamos nuo trijų iki septynių parų 30 °C temperatūroje 5 % CO₂ aplinkoje. Ant agarizuotos terpės bakterijos buvo auginamos tokiomis pačiomis sąlygomis, kol pasirodydavo kolonijos, t.y. nuo dviejų iki trisdešimties parų.

2.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandininė reakcija buvo vykdoma *Eppendorf Mastercycler Personal* amplifikatoriumi. Į reakcijos mišinį buvo dedama DNR pavyzdžio, specifinių pradmenų, termostabilios *Taq* polimerazės, amonio jonų turinčio buferio, magnio jonų ir dNTP. Naudota PGR programa: 94 °C 4 min.; 94 °C 30 sek., 45 °C 2 min., 68 °C 4 min. – 35 ciklai; 68 °C 7 min.; 4 °C 24 val. .

2.5. PGR naudoti pradmenys

2.1 lentelė.

Oligonukleotidai	Seka	PGR produktas
SW4 for/SW5 rev (Lee ir kt., 2008)	GAGCTTTTGCATGCAAAAATTTC/	Ilgasis <i>oriC</i> fragmentas (1,96 kb)
SW6 for/SW7 rev (Lee ir kt., 2008)	TTGTTAATCCATGGAATGATCATAA	Trumpasis <i>oriC</i> fragmentas (0,67 kb)
SW4 for/SW7 rev (Lee ir kt., 2008)	CCTCAGCTGCAGTAGGTTATG/ GAACTGAAATGTCTGACTAAAAATC	Visa <i>oriC</i> sritis (3,16 kb)
SW4 for/SW9 rev (Lee ir kt., 2008)	/CTGATGCCGTTAGCATTAGG	G3 <i>oriC</i> fragmentas (1,06 kb)
SW4 for/PLori-rev-2 (Lee ir kt., 2008)	/CAGATAGACAAAAGAATGAAAAA AG	G4 <i>oriC</i> fragmentas (707 bp)
SW4 for/PLori-rev-4	/CACAATATTTCCGATAAAAATCAC	G5 <i>oriC</i> fragmentas

(Lee ir kt., 2008) SW4 for/PLori-rev-5	/TTTTACAAACAATATTGTTAC	(510 bp) G6 <i>oriC</i> fragmentas
(Lee ir kt., 2008) SW4 for/PLori-rev-6	/ACACGTTTTTTGTGAAAAAGTGA	(459 bp) G7 <i>oriC</i> fragmentas
(Lee ir kt., 2008)		(180 bp)
TET-for/TET-rev	TCTAACAATGCGCTCATCATCGTCA TC/ TTCCGAATACCGCAAGCGACAG	Atsparumo tetraciklinui geno fragmentas (739 bp)

2.6. DNR fragmento skyrimas iš agarozinio gelio

DNR fragmentai buvo skiriami naudojant DNR išskyrimo rinkinį (*Fermentas*, Lietuva) ir laikantis gamintojo rekomendacijų. 10 µl PGR mišinio po amplifikacijos įnešama į 1 % agarozės gelį. Išpjautas ir pasvertas agarozės gabalėlis, turintis 1,5 kb dydžio fragmentą, dedamas į mėgintuvėlį ir užpilamas 3 tūriais natrio jodido tirpalo. Taip paruoštas pavyzdys inkubuojamas 5 min. 55 °C temperatūroje. Ištirpus agarozei į mėgintuvėlį įdedama 5 µl silicio miltelių suspensijos, gerai sumaišoma ir vėl inkubuojama 5 min. 55 °C temperatūroje. Adsorbuota prie silicio miltelių DNR nusodinama centrifuguojant 1 min. 16000 g. Nuosėdos užpilamos 500 µl praplovimo buferio, gerai suspenduojamos ir centrifuguojama kaip aprašyta anksčiau. Šis etapas kartojamas 3 kartus. Po paskutinio praplovimo ant nucentrifuguotų nuosėdų užpilama 30 µl dejonizuoto vandens, suspenduojama ir inkubuojama 5 min. 55 °C temperatūroje. Po centrifugavimo atsargiai surinktas supernatantas perkeliamas į švarų mėgintuvėlį ir analizuojamas agarozės gelyje.

2.7. DNR ligavimas

PGR būdu amplifikuoti ir išskirti iš agarozinio gelio fragmentai buvo liguojami T4 DNR ligaze su plazmidiniu vektoriumi 10 °C temperatūroje 15–17 valandų. Po to mišinys inkubuojamas 10 min. 65 °C temperatūroje ir atvėsinaamas lede. Tokiu ligavimo mišiniu transformuojamos *E. coli* DH5α ląstelės.

2.8. Kompetentinių *E.coli* ląstelių ruošimas ir elektroporacija

E. coli DH5α ląstelės buvo auginamos 3–4 val. 20 ml NB terpės 30 °C temperatūroje aeruojant, kol optinis tankis (A_{600}) pasiekė 0,3–0,5. Ląstelių augimas buvo

sustabdomas palaikant kultūrą 15 min. ledo vonioje. Po to ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant šaltai 30 min. 5000 g. Nupylus augimo terpę ląstelės buvo du kartus praplaunamos 10 ml šalto 10 % glicerolio tirpalu: suspenduojamos glicerolyje ir centrifuguojamos anksčiau minėtomis sąlygomis. Gauta ląstelių biomasė buvo suspenduojama 1 ml šalto 10 % glicerolio. Taip paruošta ląstelių suspensija buvo išpilstoma po 100 µl į mėgintuvėlius ir naudojama elektroporacijai.

Prieš transformaciją ląstelės ir kiuvetės buvo 20 min. šaldomos ledo vonioje, kad lėtai atitirptų. 100 µl elektrokompetentinių ląstelių buvo dedama 1 µl DNR ir inkubuojama keletą minučių lede. Tuomet ląstelių suspensija su DNR buvo perpilama į atšaldytą 1 mm pločio plyšio kiuvetę. Transformacija buvo atliekama elektroporacijos būdu, naudojant 2 kV įtampą. Elektros impulso trukmė 4–5 ms. Po elektroporacijos ląstelės buvo skubiai perkeliamos į 1ml NB terpės ir inkubuojamos 30–60 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės buvo išsėjamos ant standžios agarizuotos terpės (Sharma ir Schimke, 1994).

2.9. Plazmidžių išskyrimas

Plazmidės buvo skiriamos šarminės denatūracijos metodu (Sambrook ir kt., 1989). Atrinktos kolonijos buvo auginamos per naktį 37 °C termostate ant NA terpės su ampicilinu.

Nuo lėkštelės su kilpele buvo paimama bakterinių ląstelių, suspenduojama 100 µl I-mo tirpalo (1 tūris) ir laikoma 15–20 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos buvo įpilami 2 tūriai II-o tirpalo ir palaikoma apie 10 min. kambario temperatūroje, kol ląstelės visiškai suirdavo. Kai tirpalas nuskaidrėdavo, buvo pripilama 1,5 tūrio 7,5 M amonio acetato tirpalo ir švelniai sumaišius laikoma ~1 val. ledo vonioje, kol iškrisdavo nuosėdos. Gautas tirpalas buvo centrifuguojamas (15 min., 10000 g). Į supernatantą buvo pripilami 2 tūriai etilo alkoholio ir paliekama – 20°C temperatūroje 2 val.. DNR buvo surenkama centrifuguojant 20 min. 10000 g, išdžiovinama ir kambario temperatūroje ištirpinama nedideliame kiekyje vandens.

I-as tirpalas: 1360 µl H₂O, 100 µl 1 M Tris-OH (pH 8,0), 500 µl 40 % gliukozės, 40 µl 0,5 M EDTA.

II-as tirpalas: 0,2 N NaOH, 1 % SDS.

2.10. DNR elektroforezė

DNR elektroforezė buvo atliekama horizontaliame 0,8–1,0 % agarozės gelyje TAE buferyje. Po elektroforezės gelis buvo dažomas etidžio bromido tirpale ir analizuojamas ultravioletinėje šviesoje.

50 x TAE buferis: 121 g Tris-OH, 18,6 g natrio EDTA, 28,6ml acto rūgšties (99,5%), H₂O iki 500ml.

2.11. DNR veikimas restrikcijos endonukleazėmis

DNR buvo hidrolizuojama KpnI, SmaI, Eco32I, HindIII ir EcoRI restrikcijos endonukleazėmis (*Fermentas*, Lietuva) laikantis gamintojo pateiktą rekomendacijų. 0,2–1,5 µl DNR buvo veikiami 5–10 u atinkamos restrikcijos endonukleazės reikiamame buferyje 1 val. 37 °C temperatūroje.

2.12. *M. gallinarum* elektroporacija

Ląstelių kultūra buvo užauginama iki vidutinės *log* fazės. Vienai transformacijai buvo naudojama 5 ml kultūros. Centrifuguota kambario temperatūroje ties 12000 g 10 min.. Nuosėdos buvo suspenduojamos tokiam pačiam kaip pradinis tūris HEPES-sacharozės buferio tūryje ir nedelsiant centrifuguojamos dar kartą. Ląstelės buvo suspenduojamos apytiksliai 1/300 pradinio tūrio HEPES-sacharozės buferio ir įstatomos į ledus. Pridedėjus 10 µg DNR, ląstelių-DNR mišinys buvo perkeliamas į atšaldytą 0,2 cm plyšio kiuvetę ir elektroporuojama. Naudota 2,5 kV įtampa ir 5–6 ms impulsas. Po elektroporacijos ląstelės buvo suspenduojamos 1 ml šaltos augimo terpės ir inkubuojamos 10 min. kambario temperatūroje. Tada 2–3 val. perkeliama į 37 °C termostatą. Po gaivinimo ląstelės buvo išsėjamos ant standžios agarizuotos terpės (Minion ir Kapke, 1998).

HEPES-sacharozės buferis: 8 mM HEPES, 272 mM sacharozės, pH 7,4.

2.13. Cheminė *M. gallinarum* transformacija

Ląstelių kultūra buvo užauginama iki vidutinės ar vėlyvosios *log* fazės. Vienai transformacijai buvo naudojama 5 ml kultūros. Centrifuguota 4 °C temperatūroje ties 12000 g

10–15 min. Nuosėdos buvo suspenduojamos 1/20 pradinio tūrio 0,1 M CaCl₂ ir 30–60 min. inkubuojama leduose. DNR, kuria bus transformuojama, buvo perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlį ir iki 50 μl papildoma CaCl₂. Tada buvo pridedama 250 μl ląstelių suspensijos, sumaišoma ir perkeliama į kitą mėgintuvėlį, su 2 ml PEG (40, 50 arba 70 % kambario temperatūroje). 5–10 sek. buvo purtoma, kad gerai susimaišytų, ir nedelsiant praskiedžiama 25 ml TE buferio. Tada buvo centrifuguojama 4 °C temperatūroje 30 min. ties 12000 g, nupilamas supernatantas ir užpilama 1,5 ml šiltos augimo terpės. Papurčius 10–15 sek. nuo sienelių buvo nuplaunamos ląstelės. Po 1,5 val. inkubacijos 37 °C temperatūroje buvo išsėjama ant standžios agarizuotos terpės (Minion ir Kapke, 1998).

TE buferis: 10 mM Na₂HPO₄, 0,150 mM NaCl, pH 7,3.

2.14. Genominės DNR išskyrimas

M. gallinarum genominė DNR buvo išskiriama Qiagen rinkiniu „QIAmp DNA Stool Mini Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas. Iki 220 mg ląstelių biomasės suspenduojama 1,4 ml pirmojo buferio ir 5 min. kaitinama 70 °C temperatūroje. Tada 15 sek. papurtoma ir 1 min. centrifuguojama ties 20000 g kambario temperatūroje. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį, įdedama teršalus surišanti tabletė ir iš karto stipriai purtoma, kol tabletė ištirpsta. Vėl centrifuguojama tokiomis pačiomis sąlygomis 3 min. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir dar kartą 3 min. centrifuguojama. Supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį, kuriame jau įdėta 15 μl proteinazės K. Užpilama tokiu pačiu tūriu antrojo buferio ir 10 min. kaitinama 70 °C temperatūroje. Po to užpilamas toks pats kaip ir antrojo tirpalo tūris etanolio ir sumaišoma. Tirpalas pilamas į kolonėlę ir 1 min. centrifuguojama. Supernatantas nupilamas, o į kolonėlę pilama 500 μl trečiojo buferio ir vėl centrifuguojama 1 min. Supernatantas nupilamas, į kolonėlę pilama 500 μl ketvirtojo buferio ir centrifuguojama 3 min. Kolonėlė perkeliama į naują mėgintuvėlį ir užpilama 50 μl eliuacijos buferio. Inkubuojama 1 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min. Filtrą perėjusiame tirpale yra išskirta DNR.

2.15. PGR produkto gryninimas

PGR produktai, kurie buvo naudojami kaip zondai hibridizacijai, buvo gryninami su *Roche* rinkiniu „High Pure PCR Product Purification Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas. PGR mišinys praskiedžiamas iki 100 µl surišimo buferiu ir perkeliama į kolonėlę su filtru. Centrifuguojama 30–60 sek. maksimaliu greičiu, po to nupilamas filtrą perėjęs skystis. Užpilama 500 µl plovimo buferio, centrifuguojama 1 min. maksimaliu greičiu ir nupilamas filtrą perėjęs skystis. Vėl kartojama tas pats užpilant 200 µl plovimo buferio. Tada kolonėlė su filtru perkeliama į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį. Užpilama 50–100 µl eliucijos buferio ir centrifuguojama 1 min. Filtrą perėjusiame tirpale yra išvalyta PGR metu padauginta DNR.

2.16. Hibridizacijos zondo žymėjimas biotinu

Zondas hibridizacijai buvo žymimas biotinu naudojant *Fermento* rinkinius „Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit“. Į 1,5 ml mėgintuvėlį dedama 100–1000 ng žymimos DNR, 10 µl 5x reakcijos buferio ir vandens iki 44 µl. Mišinys 5–10 min. paverdamas ir greitai atvėsinaamas leduose. Tada pridedama 5 µl žymėjimo mišinio ir 1 µl egzozonukleazinio aktyvumo neturinčio Klenovo fragmento. Inkubuojama per naktį 37 °C temperatūroje. Reakcija stabdoma pridedant 1 µl 0,5 M EDTA.

2.17. Hibridizacijos zondo žymėjimas digoksigeninu

Zondas hibridizacijai buvo žymimas digoksigeninu naudojant *Roche* rinkinį „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“. Į 1,5 ml mėgintuvėlį dedama 1 µg žymimos DNR ir atskiedžiama iki 16 µl. Mišinys 5–10 min. paverdamas ir greitai atvėsinaamas leduose. Į denatūruotą DNR dedama 4 µl žymėjimo mišinio ir inkubuojama 37 °C per naktį. Reakcija stabdoma 10 min. pakaitinant 65 °C.

2.18. Šarminis DNR perkėlimas ant membranos

Po elektroforezės agarozės gelyje DNR, kuri bus naudojama hibridizacijai, turi būti perkelta ant nailoninės membranos. Tam, visų pirma, depurinuojama du kartus po 15 min. gelį palaikant 5–10 tūrių 0,25 M HCl. Tada gelis nuplaunamas vandeniu ir du kartus po 15 min. palaikomas 5–10 tūrių 0,4 M NaOH. Ant pakyltos, esančios 0,4 M NaOH tirpalo talpoje,

dedami du 0,4 M NaOH sudrėkinti Vatmano lapai. Jie turi būti ilgesni už pakylą ir nusileisti į 0,4 M NaOH perkėlimo tirpalą. Ant viršaus dedamas agarozės gelis, o ant jo – tokio paties dydžio nailoninė membrana. Ant viršaus dedami dar keturi membranos dydžio sudrėkinti Vatmano lapai ir stikline lazdele pašalinami oro burbulai. Galiausiai sukraunamas storas sluoksnis popierinių rankšluosčių ir paslegiama 100 g svareliu. Gelis iš visų pusių apskamas plėvele, kad nesudžiūtų. Perkėlimas trunka 2 val. Po to membrana 5 min. plaunama 2 x SSC buferiu, išdžiovinama ir laikoma 4 °C.

20 x SSC buferis: 3 M NaCl, 300 mM Na₃C₆H₅O₇, pH 7.

2.19. Neutralus DNR perkėlimas ant membranos

Jei naudojamas digoksigeninu žymėtas DNR molekulinį masių žymuo, spartesnis šarminis perkėlimas netinka, nes digoksigeninas prijungtas aukštam pH jautria jungtimi. Tada naudojamas ilgiau trunkantis neutralus DNR perkėlimas ant membranos. Po elektroforezės depurininama agarozės gelį du kartus po 10 min. palaikant 5–10 tūrių 0,25 M HCl. Praplaunama vandeniu. Tada DNR denatūruojama gelį du kartus po 15 min. palaikant denatūravimo buferyje ir neutralizuojama du kartus po 15 min. palaikant neutralizavimo buferyje. Galiausiai 10 min. palaikoma 20 x SSC buferyje. Ant pakylės, esančios 20 x SSC tirpalo talpoje, dedamas vienas 20 x SSC sudrėkintas Vatmano lapas. Jis turi būti ilgesnis už pakylą ir nusileisti į 20 x SSC perkėlimo tirpalą. Ant viršaus dedamas agarozės gelis, o ant jo – tokio paties dydžio nailoninė membrana. Membrana užklojama dar vienu tokio paties dydžio 20 x SSC sudrėkintu Vatmano lapu ir storu sluoksniu popierinių rankšluosčių. Paslegiama 500 g svareliu ir paliekama persikelti pernakt. Po perkėlimo DNR fiksuojama prie membranos pusę valandos pakaitinant 120 °C. Iki naudojimo laikoma 4 °C.

Denatūravimo buferis: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH.

Neutralizuojantis buferis: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5.

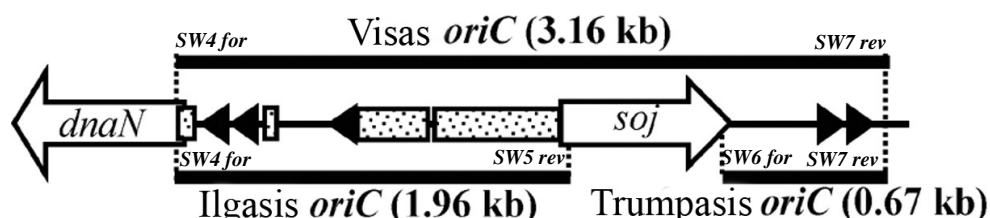
20 x SSC buferis: 3 M NaCl, 300 mM Na₃C₆H₅O₇, pH 7.

3. REZULTATAI

3.1. *OriC* srities klonavimas

Plazmidei su replikacijos pradžios sritimi (*oriC*) sukonstruoti visų pirma reikėjo klonuoti *oriC* sritį iš tos rūšies, kuriai kuriamas vektorius, genomo. Kadangi *Mycoplasma gallinarum* genomas dar nėra sekvenuotas, nėra žinoma jo *oriC* sritį sudarančios DNR seka, pagal kurią galima būtų sukurti pradmenis srities amplifikacijai PGR metodu. Todėl buvo pasinaudota pradmenimis, skirtais *Mycoplasma gallisepticum oriC* srities amplifikacijai, tikintis, kad šių artimų rūšių sekos bus panašios ir amplifikacija įvyks (Lee ir kt., 2008).

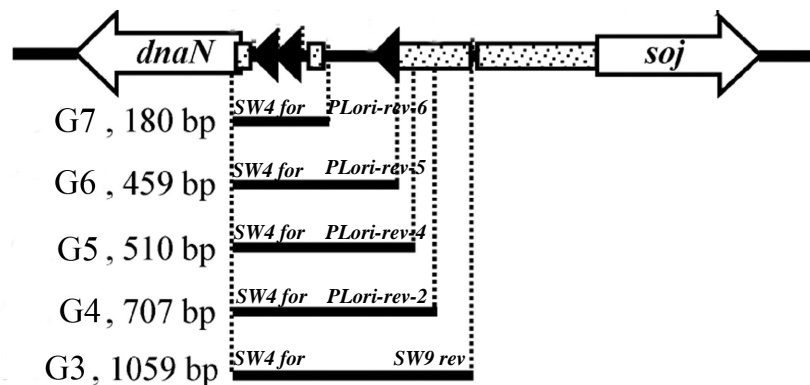
Panaudotos aštuonios pradmenų poros, kuriomis siekta padauginti skirtingo dydžio *oriC* srities fragmentus. Pradmenys *SW4 for* ir *SW7 rev* skirti visai *oriC* sričiai nuo *dnaN* iki *dnaA* geno. Pradmenys *SW4 for* ir *SW5 rev* skirti ilgajam *oriC* srities fragmentui nuo *dnaN* iki *soj* geno, į kurį įeina trys DnaA dėžutės ir keturi AT klasteriai, o pradmenys *SW6 for* ir *SW7 rev* – trumpajam fragmentui nuo *soj* iki *dnaN* geno, į kurį įeina dvi DnaA dėžutės, tačiau nėra AT klasterių (3.1 pav.).



3.1 pav. Schematinis *M. gallisepticum oriC* srities fragmentų, amplifikuojamų PGR metu, vaizdas. Juodi trikampiai žymi DnaA dėžučių konsensus sekas, o tamsesni stačiakampiai – AT klasterius (modifikuota pagal Lee ir kt., 2008).

Iš ankstesnių tyrimų žinoma, kad kuo ilgesnis *oriC* srities fragmentas yra plazmidėje, tuo didesnė tikimybė, kad ji homologinės rekombinacijos būdu integruosis į genomine *oriC* sritį (Lee ir kt., 2008; Cordova ir kt., 2002, Lartigue ir kt., 2002; Renaudin ir kt., 1995). Tai nėra pageidautina savybė, ypač jei vektorius naudojamas inaktyvuoti genams ir reikalinga homologinė rekombinacija kitose genomo vietose. Todėl dar penkios pradmenų poros panaudotos trumpesniems *oriC* srities fragmentams gauti. *SW4 for* ir *SW9 rev* – 1059 bp G3

fragmentui, *SW4 for* ir *PLori-rev-2* – 707 bp G4 fragmentui, *SW4 for* ir *PLori-rev-4* – 510 bp G5 fragmentui, *SW4 for* ir *PLori-rev-5* – 459 bp G6 fragmentui, o *SW4 for* ir *PLori-rev-6* – 180 bp G7 fragmentui (3.2 pav.). Visi su šiais pradmenimis gauti fragmentai tiko sėkmingai plazmidės replikacijai *M. gallisepticum* ir padidino jos stabilumą. Mažiausias fragmentas, kuris dar buvo funkcionalus – 180 bp su dviem DnaA dėžutėmis bei dviem AT klasteriais (Lee ir kt., 2008).

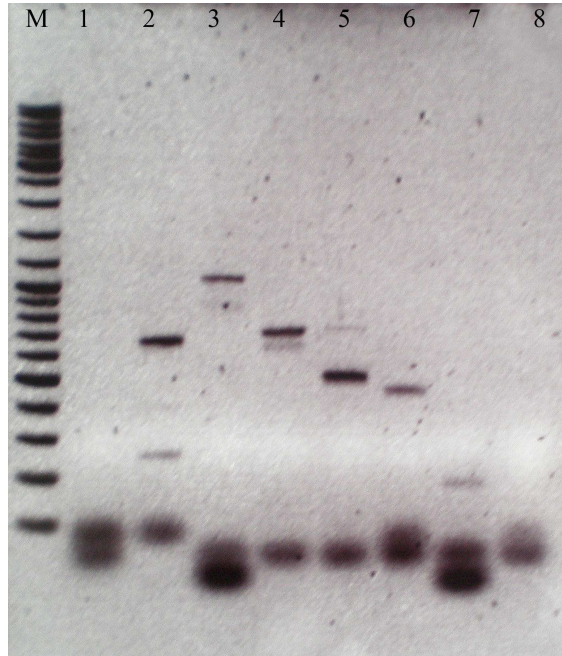


3.2 pav. Schematinis mažesnių *oriC* srities fragmentų, amplifikuojamų PGR metu, vaizdas. Juodi trikampiai žymi DnaA dėžučių konsensus sekas, o tamsesni stačiakampiai – AT klasterius (modifikuota pagal Lee ir kt., 2008).

PGR metu pavyko amplifikuoti visus, išskyrus pačius ilgiausius fragmentus – 3,16 bazių porų ilgio visą *oriC* sritį bei 1,96 bazių porų ilgio ilgąjį *oriC* fragmentą (3.3 pav.). Nesėkmė amplifikuojant pastaruosius greičiausiai susijusi su ne optimaliomis PGR sąlygomis ilgiems fragmentams susidaryti, nes tų pačių fragmentų negauta ir kontrolinėse reakcijose su *M. gallisepticum* DNR. Be to, pradmenys visai *oriC* sričiai *SW4 for* bei *SW7 rev* sėkmingai veikė amplifikuojant kitus fragmentus, tad šio produkto gauti nepavyko tikrai ne dėl komplementarumo stokos.

Sėkmingai amplifikuotus fragmentus reikėjo įterpti į vektorius, galintį replikuotis *Escherichia coli*. Buvo pasirinktas pTZ57R/T, turintis replikacijai *E. coli* reikalingą sritį *rep* ir atsparumo beta laktaminiams antibiotikams geną. Šis vektorius vidury daugybinio klonavimo srities yra perkirptas ir turi lipnius timino galus. PGR metu naudota *Taq* polimerazė amplifikuojamuose fragmentuose palieka lipnius adenino galus, tad ligavimo metu jie yra įterpiami į vektorius daugybinio klonavimo srities viduryje. Tikriausiai dėl per

mažo PGR produkto kiekio, klonuoti pavyko tik gausiausiai padaugintus *oriC* srities fragmentus – G3, G5 ir G6.



3.3 pav. PGR produktų elektroforezės nuotrauka. 1 takelyje ilgasis *oriC* fragmentas, 2 – trumpasis *oriC* fragmentas, 3 – G3 fragmentas, 4 – G4 fragmentas, 5 – G5 fragmentas, 6 – G6 fragmentas, 7 – G7 fragmentas, o 8 – visai *oriC* sritis. M – žymuo, molekulinė masė (bp) nuo apačios: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 ir 10000.

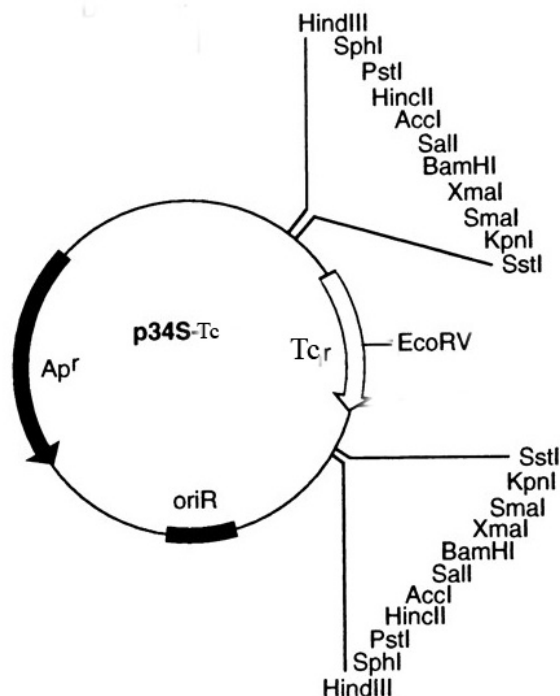
Buvo nustatytos visų trijų klonuotų *oriC* fragmentų DNR sekos. Visų pirma jos palygintos tarpusavyje. Kaip ir buvo galima tikėtis, persidengiančios fragmentų sritys buvo identiškios. Po to klonuotų fragmentų DNR sekos buvo palygintos su atitinkamomis *M. gallisepticum* sekomis (3.4 pav.). Ilgiausiame, G3 fragmente, iš 1025 nukleotidų nesutapo tik 9, tad sekų panašumas labai didelis – net 99 %. Fragmente, kaip ir buvo nurodyta literatūroje, yra trys DnaA dėžutės (Lee ir kt., 2008). Dvi iš jų, esančios šalia, atitinka mikoplazmų DnaA dėžučių konsensuso seką TT(A/T)TC(C/A)ACA ir yra TTATCCACA bei TTATCAACA. Trečioji skiriasi nuo konsensuso sekos vienu nukleotidu ir yra TTATCAACT. Neaišku, ar ji yra atpažįstama DnaA baltymo, tačiau tikrai žinoma, kad yra nebūtina ir replikacijai pakanka pirmųjų dviejų DnaA dėžučių (Lee ir kt., 2008).

MGLS	aaaaaatttcattagatatatTTTTATTTTTATTTTTATTATTAACCATGATGAATTTGTTGATAAATCT
MGLN	aaaaaatttcattagatatatTTTTATTTTTATTTTTATTATTAACCATGAGGAATTTGTTGATAAATCT
MGLS	gtggataaactcctaaaaaaattcgggatttataaaaagtacattaaaatatttataatTTTAATGTAATAAT
MGLN	gtggataaattcctaaaaaaattcgggatttataaaaagtacattaaaatatttataatTTTAATGTAATAAT
MGLS	tatattTTTAATGTAATAATCTATTATATCACTTTTTCCAAAAACGTGTATTATATATAAGGAGTTTTGTA
MGLN	tatattTTTAATGTAATAATCTATTATATCACTTTTTCCAAAAACGTGTATTATATATAAGGAGTTTTGTA
MGLS	aattattTTAACTATATTACTATGTAATATAGTTATTATATCAAAACAAACTAAAACAGTAGAGCAACCT
MGLN	aattattTTAACTATATTACTATGTAATATAGTTATTATATCAAAACAAACTAAAACAGTAGAGCAACCT
MGLS	ttaaaaaTTAACTAAAACTAAATACTAAATTTGTTTATAGACGAAAGTTTTCTATTAATATCCCCACA
MGLN	ttaaaaaTTAACTAAAACTAAATACTAAATTTGTTTATAGACGAAAGTTTTCTATTAATATCCCCACA
MGLS	ttaactctatcaaaaccctatact-aaaaaaaaaa-acacactctgaatacataacttgtatgtaaag
MGLN	ttaactctatcaaaaccctatact-aaaaaaaaaa-cacacactctgaatacataacttgtatgtaaag
MGLS	tttgagtgaagTTAAATCGCTTTAATATTGTAACAATATTGTTTGTAAAAATTTTATTTAATATGAAA
MGLN	tttgagtgaagTTAAATCGCTTTAATATTGTAACAATATTGTTTGTAAAAATTTTATTTAATATGAAA
MGLS	aaaatattgtaacaatattgTTTGTAAAAATTTTATTTAATATGAAAAAATATTGTGATTTTTATCG
MGLN	aaaatattgtaacaatattgTTTGTAAAAATTTTATTTAATATGAAAAAATATTGTGATTTTTATCG
MGLS	gaaatattgtgattTTTTATCGGAAATATTGTGATTTCTAATTCAGGCCAATTAATAATCAAAACTA
MGLN	gaaatattgtgattTTTTATCGGAAATATTGTGATTTCTAATTCAGGCCAATTAATAATCAAAACTA
MGLS	attacttAAATAAAAAATATCAATAAATAAATTAAAAACTTATTAACATTTTCTACTAAGAGAGTTGGT
MGLN	attacttAAATAAAAAATATCAATAAATAAATTAAAAACTTATTAACATTTTCTACTAAGAGAGTTGGT
MGLS	atttgGAAATAATATTAAGTAATACACAATATTAAAAAATATTATTAGTATTTAAACGATTAAGTAC
MGLN	atttgGAAATAATATTAAGTAATACACAATATTAAAAAATATTATTAGTATTTAAACGATTAAGTAC
MGLS	TTTTTCATTCCTTTGTCTATCTGTAAGACACTAGGTAAGGATTACTTTATTAACAAGATAAAGAGAA
MGLN	TTTTTCATTCCTTTGTCTATCTGTAAGACACTAGGTAAGGATTACTTTATTAACAAGATAAAGAGAA
MGLS	aagaatttattTTTAATAATACGATTTTAATATTTTTAAAATATTATTCAATTCAGTTGTTTTATTAC
MGLN	aagaatttattTTTAATAATACGATTTTAATATTTTTAAAATATTATTCAATTCAGTTGTTTTATTAC
MGLS	caaaaatagaatattAAAACAATATTTATAAGTTAATTAATAACTTTTTAAAACAAAACAACAA
MGLN	caaaaatagaatattAAAACAATATTTATAAGTTAATTAATAACTTTTTAAAACAAAACAACAA
MGLS	tattatttcaaatatgggtcacagtagtcacaataaagttgataatatttAAATAATATTAATTAATATT
MGLN	tattatttcaaatatgggtcacagtagtcacaataaagttgataatatttAAATAATATTAATTAATATT
MGLS	tattcaagaatttattattcttgaataacagcaaaa-aa-cttttatagaactgaagagcattcttAAA
MGLN	tattcaagaatttattattcttgaataacagcaaaa-taa-cttttatagaactgaagagcattcttAAA
MGLS	aaagaaaaaa
MGLN	aaagaaaaaa

3.4 pav. *M. gallisepticum* ir *M. gallinarum* *oriC* srities G3, G5 ir G6 fragmentų DNR sekų palyginimas. Pateiktos komplementarios sekos, kad atitektų fragmentų orientaciją vektoriuose. „MGLS“ žymi *M. gallisepticum* nukleotidų seką, o „MGLN“ – *M. gallinarum*. Neatitikimai pažymėti rėmeliais, DnaA dėžutės – pilka spalva, o fragmentų pabaiga – vertikaliais brūkšniais.

3.2. Žymens įterpimas

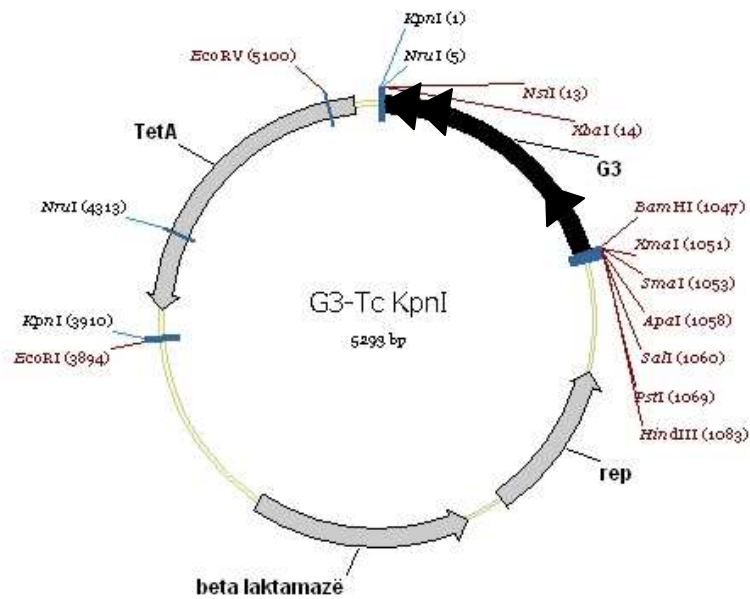
Tam, kad konstruojamas vektorius tiktų naudoti, reikalinga ne tik *oriC* sritis, bet ir žymuo, kuris leistų atrinkti transformuotas ląsteles. Nutarta naudoti atsparumo antibiotikams geną. Konstruojamo vektoriaus karkasą sudarančioje pTZ57R/T plazmidėje jau yra beta laktamazė, suteikianti atsparumą beta laktaminiams antibiotikams. Tačiau atrankai mikoplazmų ląstelėse šie antibiotikai netinka, nes jie veikia neleiddami susiformuoti peptidoglikano sluoksniui ir neveikia sienelės neturinčių mikroorganizmų. Tad reikėjo pasirinkti kitą antibiotiką, kuriam *M. gallinarum* ląstelės būtų jautrios. Patikrintas šių ląstelių atsparumas tetraciklinui (Tc), chloramfenikoliui (Cm), gentamicinui (Gm) ir kanamicinui (Km). Ląstelės buvo išsėjamos agarizuotoje augimo terpėje su 1 ir 10 µg/ml kiekvieno antibiotiko koncentracija. Ląstelės žuvo augdamos ant terpės su 1 ir 10 µg/ml tetraciklino ir 10 µg/ml chloramfenikolio. Kadangi stipriausiai veikė tetraciklinas, jis ir pasirinktas atrankai. Atsparumą tetraciklinui nutarta suteikti į vektorių klonuojant *tetA* geną, koduojantį membraniinį tetraciklino/metalų jonų-protono priešnašos baltymą. Šis genas buvo gautas iš p34S-Tc plazmidės (3.5 pav.) (Dennis ir Zylstra, 1998).



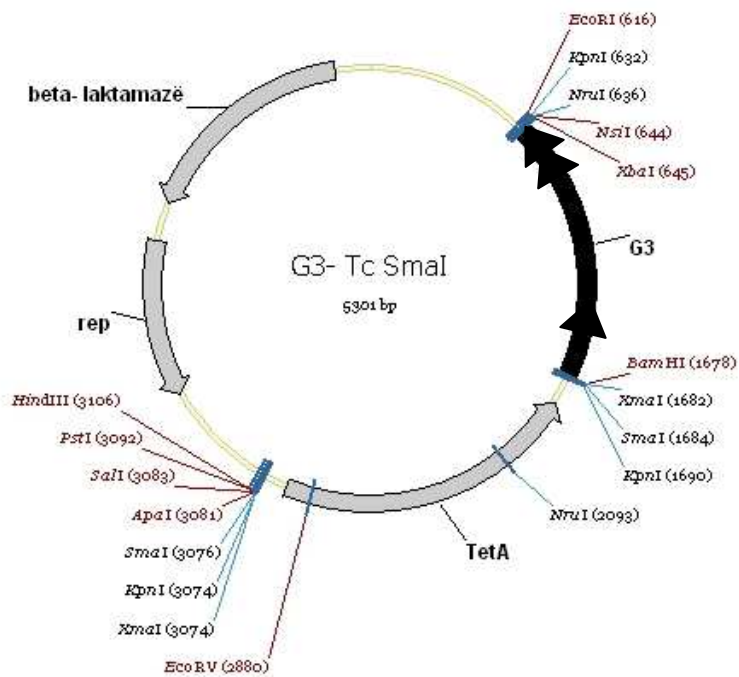
3.5 pav. p34S-Tc plazmidės, iš kurios buvo gautas atsparumo tetraciklinui genas, schema (modifikuota pagal Dennis ir Zylstra, 1998).

Iš literatūros žinoma, kad *oriC* fragmento padėtis kitų plazmidės elementų atžvilgiu gali turėti įtakos vektoriaus funkcionalumui (Cordova ir kt., 2002). Todėl atsparumo tetraciklinui geną *tetA* nutarta įterpti dvejopai – ir iš vienos, ir iš kitos *oriC* fragmento pusės. Tam p34S-Tc plazmidė buvo hidrolizuota dviem restrikcijos endonukleazėmis – KpnI ir SmaI. *TetA* genas su KpnI suformuotais lipniais galais buvo įterptas tarp *oriC* fragmento ir beta laktamazės geno, o *tetA* genas su SmaI suformuotais bukais galais – iš kitos *oriC* fragmento pusės. Klonavimo eksperimentai buvo atlikti *E. coli* ląstelėse ir atrinkti tie vektoriai, kurie suteikė atsparumą ir ampicilinui, ir tetraciklinui. Tačiau atsparumo tetraciklinui genas *tetA* dėl tos pačios restrikcijos endonukleazės suformuotų abiejų fragmento galų galėjo įsiterpti ir pasroviui, ir prieš srovę, o vektoriaus stabilumui svarbu, kad visi genai būtų pasroviui. Todėl buvo patikrinta *tetA* geno kryptis hidrolizuojant atrinktus vektorius HindIII ir EcoRV restrikcijos endonukleazėmis. Pagal hidrolizės produktų dydį atrinkti vektoriai su reikiamai įsiterpusiu *tetA* genu. Kadangi vektoriams kurti naudoti trys *oriC* fragmentai ir atsparumo tetraciklinui genas buvo įterpiamas abipus jų, iš viso gauti šeši skirtingi vektoriai: pG3-Tc/KpnI, pG3-Tc/SmaI, pG5-Tc/KpnI, pG5-Tc-SmaI, pG6-Tc/KpnI ir pG6-Tc/SmaI (3.6 pav., 3.7 pav. ir 3.8 pav.)

Buvo nustatytos visų šešių vektorių DNR sekos ir įsitikinta, kad sudedamosios dalys yra reikiamose vietose. Po to palygintos į vektorių sudėtį įeinančių *oriC* fragmentų nukleotidų sekos. Paaiškėjo, kad pG5-Tc/KpnI vektoriaus *oriC* fragmente netoli antrosios DnaA dėžutės atsirado mutacija – AT turtingoje srityje adenino-timino porą pakeitė guanino-citozino pora (3.9 pav.). Visų kitų vektorių *oriC* fragmentų sekos visiškai atitiko tas, kurios buvo klonuotos iš *M. gallinarum* genomo.

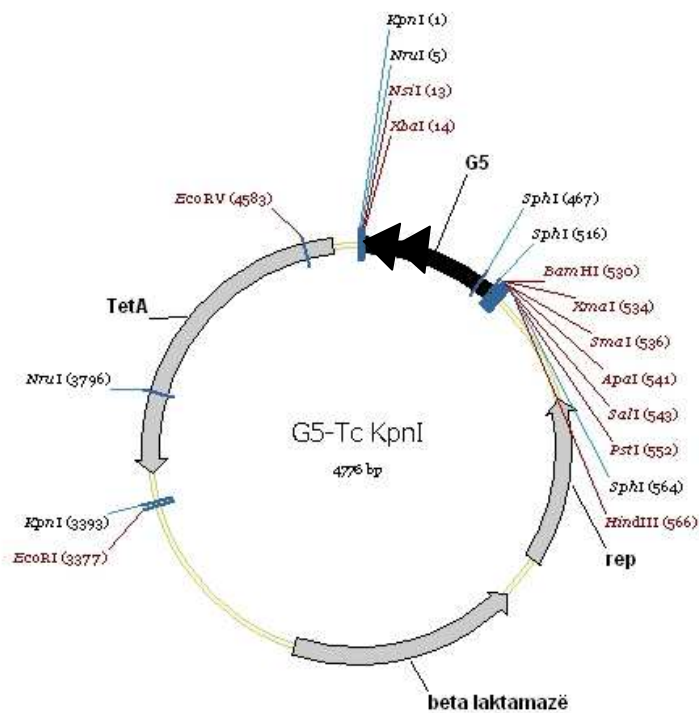


a.

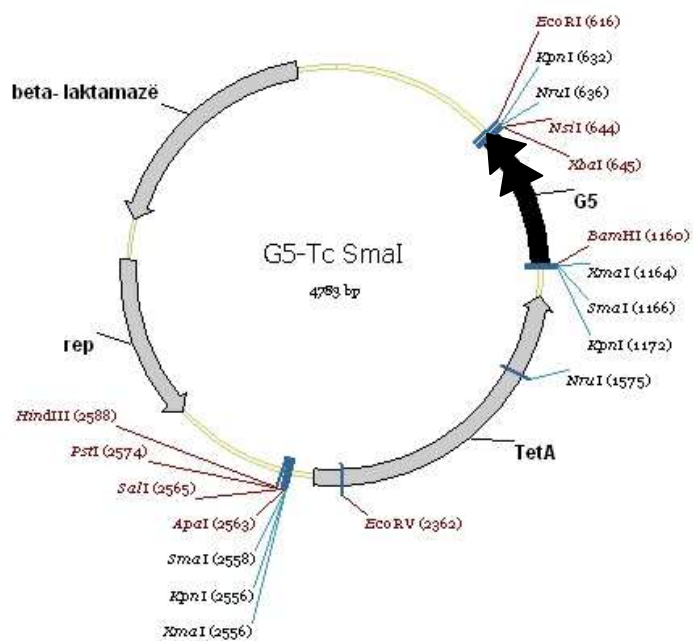


b.

3.6 pav. a Vektorius G3-Tc/KpnI, turintis G3 *oriC* fragmentą ir *tetA* geną, įstatytą per KpnI restrikcijos endonukleazės hidrolizės vietą; **b** vektorius G3-Tc/SmaI, turintis G3 *oriC* fragmentą ir *tetA* geną, įstatytą per SmaI restrikcijos endonukleazės hidrolizės vietą.

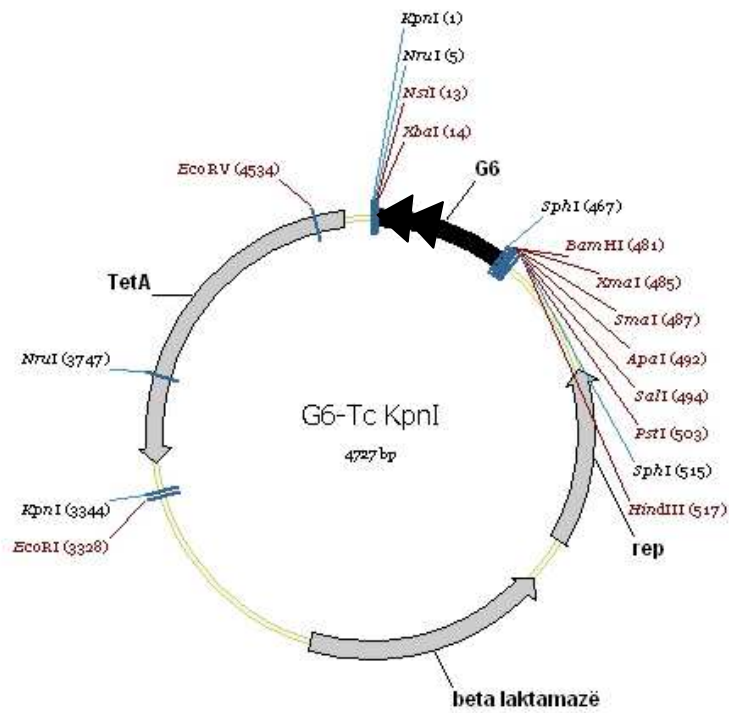


a

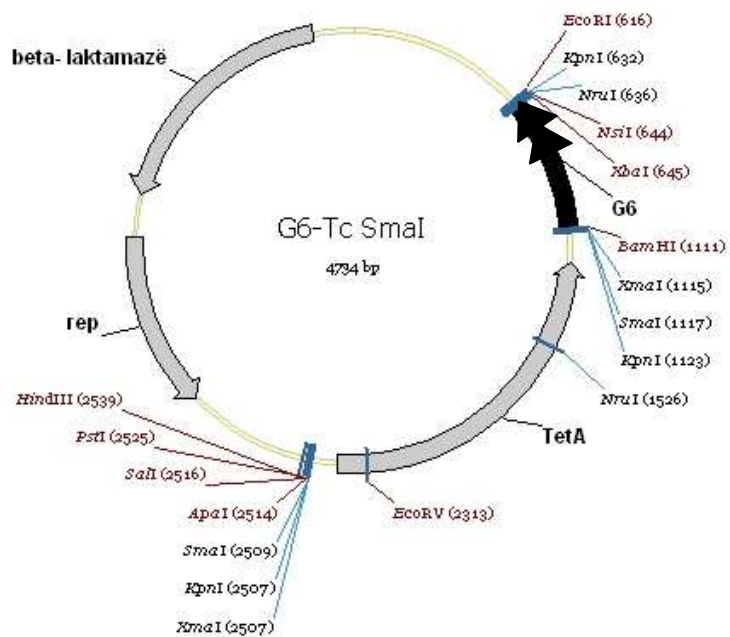


b

3.7 pav. a Vektorius G5-Tc/KpnI, turintis G5 *oriC* fragmentą ir *tetA* geną, įstatytą per KpnI restrikcijos endonukleazės hidrolizės vietą; **b** vektorius G5-Tc/SmaI, turintis G5 *oriC* fragmentą ir *tetA* geną, įstatytą per SmaI restrikcijos endonukleazės hidrolizės vietą.



a.



b.

3.8 pav. a Vektorius G5-Tc/KpnI, turintis G5 *oriC* fragmentą ir *tetA* geną, įstatytą per KpnI restrikcijos endonukleazės hidrolizės vietą; **b** vektorius G5-Tc/SmaI, turintis G5 *oriC* fragmentą ir *tetA* geną, įstatytą per SmaI restrikcijos endonukleazės hidrolizės vietą.

G5	aaaaaatttcattagatatatTTTTATTTTTATTTTTATTATTAACCATGAGAATTGTTGATAAATCT
G5*	aaaaaatttcattagatatatTTTTATTTTTATTTTTATTATTAACCATGAGAATTGTTGATAAATCT
G5	gtggataattcTAAAAAATTCTGGATTATAAAAGTACATTAATAATTTATATTTTAATGTAATAAT
G5*	gtggataattcTAAAAAATTCTGGATTATAAAAGTACATTAATAATTTATATTTTAATGTAATAAT
G5	tatattttaatgtaaatctattatatacactTTTTcAAAAACGTGTATTATATATAAGGAGTTTTGTA
G5*	tatattttaatgtaaatctattatatacactTTTTcAAAAACGTGTATTATATATAAGGAGTTTTGTA
G5	aattatttaactatattactatgtaatatagttattatatcaaaacaaactaaaacagtagagcaacct
G5*	aattatttaactatattactatgtaatatagttattatatcaaaacaaactaaaacagtagagcaacct
G5	ttaaaaattaactaaaaactaaatataaatttgTTTTATAGACGAAAGTTTTCTATTAATATCCCCACA
G5*	ttaaaaattaactaaaaactaaatataaatttgTTTTATAGACGAAAGTTTTCTATTAATATCCCCACA
G5	ttaactctatcaaaacccctataactaaaaaaaaaacacacactctgaatacataacttgTATGTAAGT
G5*	ttaactctatcaaaacccctataactaaaaaaaaaacacacactctgaatacataacttgTATGTAAGT
G5	ttgagtgaagttaaatcgctttaaatttgtaacaatattgTTTGTAAAAATTTTATTAATATGAAAA
G5*	ttgagtgaagttaaatcgctttaaatttgtaacaatattgTTTGTAAAAATTTTATTAATATGAAAA
G5	aaatattgtaacaatattgTTTGTAAAAATTTTATTAATATGAAAAAATATTGTGATTTTTATCGG
G5*	aaatattgtaacaatattgTTTGTAAAAATTTTATTAATATGAAAAAATATTGTGATTTTTATCGG
G5	aaatattgtgattTTTTATCGGAAATATTGTGATTTTCTAATTCAGGCCAATTAATAATCAAAAATAA
G5*	aaatattgtgattTTTTATCGGAAATATTGTGATTTTCTAATTCAGGCCAATTAATAATCAAAAATAA
G5	ttacttaataaaa
G5*	ttacttaataaaa

3.9 pav. Iš *M. gallinarum* klonuoto G5 *oriC* srities fragmento ir pG5-Tc/KpnI vektoriuje esančio G5 *oriC* srities fragmento DNR sekų palyginimas. Pateiktos komplementarios sekos, kad atitiktų fragmentų orientaciją vektoriuose. Mutacija pažymėta rėmeliu, chromosominis *oriC* fragmentas – G5, vektoriuje esantis *oriC* fragmentas – G5*, o DnaA dėžutės – pilka spalva.

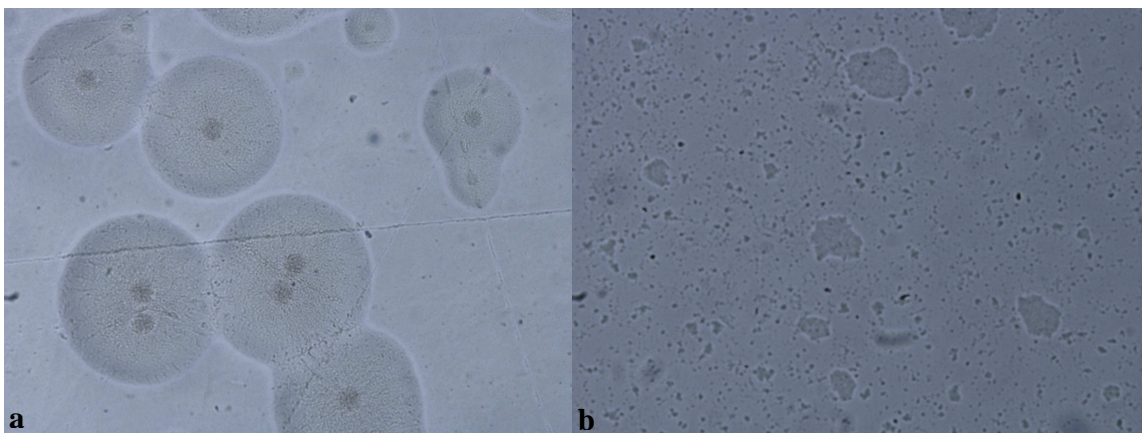
3.3. *M. gallinarum* transformacija

Duomenų, kad kas nors jau būtų bandęs transformuoti *M. gallinarum*, nėra. Iš bandymų, atliktų su kitomis mikoplazmų rūšimis, žinoma, kad vienoms efektyvesnė yra elektroporacija, o kitoms – cheminė transformacija (Minion ir Kapke, 1998). Buvo nutarta išbandyti abu metodus ir pasirinkti efektyvesnį. Abiem atvejais naudotas vienodas vektoriaus DNR kiekis ~ 100 ng ir transformuota trimis vektoriais: pG3-Tc/KpnI, pG5-Tc/KpnI ir pG6-Tc/KpnI. Po transformacijos tiek vienu, tiek kitu atveju ląstelės buvo dvi valandas gaivinamos skystoje augimo terpėje be tetraciklino, o po to išsėjamos ant agarizuotos terpės su 3 µg/ml tetraciklino. Cheminė transformacija buvo atliekama naudojant PEG. Iš literatūros žinoma, kad skirtingoms mikoplazmų rūšims reikalinga skirtinga šio junginio koncentracija,

kuri turėtų būti 40–70% ribose kambario temperatūroje (Minion ir Kapke, 1998). Todėl buvo pabandyta transformuoti naudojant 40%, 50% ir 70% PEG.

Mažas mikoplazmų kolonijas galima pastebėti tik mikroskopu. Po transformacijų tarp nuo antibiotiko žuvusių ląstelių nuolaužų ėmė augti taisyklingos apvalios sėkmingai transformuotų ląstelių kolonijos su įaugimo zona centre (3.10 pav.). Elektroporacijos atveju transformantų kolonijos pasirodė po septynių parų, o cheminės transformacijos atveju – po keturiolikos parų. Transformacijos efektyvumas elektroporuojuant buvo 6×10^{-7} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR, o transformuojant cheminiu būdu skyrėsi priklausomai nuo PEG koncentracijos. Geriausias rezultatas pasiektas naudojant mažiausią, 40 %, PEG koncentraciją – 2×10^{-7} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR. Prastesnis efektyvumas gautas naudojant 50 % PEG – 5×10^{-8} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR. O ląsteles paveikus 70 % PEG, transformantų nebuvo visai.

Visais atvejais buvo naudojamos dvi kontrolės. Teigiamai kontrolei netransformuotos *M. gallinarum* ląstelės buvo išsėjamos ant terpės be tetraciklino. Neigiamai kontrolei netransformuotos ląstelės buvo išsėjamos ant terpės su tetraciklinu. Transformuojant cheminiu būdu su 70 % PEG teigiamos kontrolės ląstelės neužaugo, tad galima teigti, kad yra jautrios tokiai didelei PEG koncentracijai. Neigiamos kontrolės ląstelės neužaugo nei vienu atveju. Tai patvirtina, kad transformantų kolonijos ant tetraciklino susidarė ne dėl mutacijų, kurių dažnis būtų panašus ir kontrolinėse ląstelėse, o dėl sėkmingo vektoriaus įvedimo. Dėl geresnio efektyvumo ir didesnio augimo greičio kituose eksperimentuose nutarta *M. gallinarum* transformuoti elektroporacijos būdu.



3.10 pav. a Intaktinės *M. gallinarum* ląstelių kolonijos; **b** žuvusios *M. gallinarum* ląstelės. Nuotraukos darytos *Nikon ECLIPSE TE 2000-U* mikroskopu.

Dėl mažo transformacijos efektyvumo mikoplazmas siūloma transformuoti dideliu plazmidinės DNR kiekiu – 3–10 µg DNR (Minion ir Kapke, 1998). Siekdami atrasti optimalų vektoriaus DNR kiekį, kad transformacijos išeiga būtų kuo didesnė, išbandėme tris plazmidinės DNR koncentracijas – 30 ng, 300 ng ir 3 µg. Transformavome visus šešis vektorius elektroporacijos būdu. Priešingai nei tikėtasi, didesnis DNR kiekis nepadidino elektroporacijos efektyvumo. Elektroporuojant ląsteles su 30 ng ir 300 ng DNR gautas panašus transformantų kiekis, kaip ir ankstesnėse transformacijose su 100 ng DNR, atitinkamai, 6×10^{-7} transformantų/KFV/µg plazmidinės DNR ir 5×10^{-7} transformantų/KFV/µg plazmidinės DNR. Naudojant 3 µg vektoriaus DNR transformacijos efektyvumas krito iki 1×10^{-8} transformantų/KFV/µg plazmidinės DNR.

Atliekant eksperimentus efektyvesniam transformacijos būdai ir optimaliam DNR kiekiui nustatyti buvo panaudoti visi šeši vektoriai. Su visais iš jų pavyko gauti transformantų kolonijų, išskyrus pG5-Tc/KpnI. Visų penkių funkcionalių vektorių transformacijos efektyvumas vienodomis sąlygomis buvo panašus. Vienintelio neveiklaus pG5-Tc/KpnI vektoriaus *oriC* srityje dar prieš pradėdant transformacijos eksperimentus buvo nustatyta mutacija (3.9 pav.). Tai, kad jo transformacija buvo nesėkminga, liudija, jog mutacija, nors įvykusi ir ne DnaA dėžutėje, trukdo vektoriaus replikacijai.

3.4. *M. gallinarum* transformantų kultivavimas

Nustačius sąlygas, kuriomis *M. gallinarum* transformacija vyksta pakankamai efektyviai, reikėjo įrodyti, kad gyvybingos ląstelės tikrai yra transformuotos. Neigiama kontrolė tik netiesiogiai patvirtina, kad atsparumas tetraciklinui atsirado ne dėl mutacijų. Tiesiogiai sėkmingą transformaciją būtų galima įrodyti tik aptikus vektorių transformuotose ląstelėse. Tam buvo nutarta naudoti DNR-DNR hibridizaciją. Šio metodo privalumas tas, kad kartu būtų nustatytas ir vektoriaus stabilumas. Kaip jau minėta anksčiau, chromosominę *oriC* sritį turintys vektoriai yra linkę homologinės rekombinacijos būdu integruotis į chromosomą. Toks jų nestabilumas yra nepageidaujama savybė, kurią stengiamasi sumažinti naudojant kuo trumpesnę *oriC* sritį.

DNR-DNR hibridizacijai atlikti buvo nutarta dar kartą transformuoti *M. gallinarum* dviem *oriC* srities ilgiu besiskiriančiais vektoriais, pG3-Tc/KpnI ir pG6-Tc/KpnI. Iš užaugusių po transformacijos kolonijų atsitiktinai buvo pasirinktos 27 pG3-Tc/KpnI

vektoriumi transformuotos kolonijos bei 22 pG6-Tc/KpnI vektoriumi transformuotos kolonijos ir persėtos į 1 ml skystos augimo terpės su antibiotiku. Po savaitės transformantai buvo persėti į 1 ml šviežios augimo terpės perkeliant į ją 100 µl senosios. Kartu buvo patikrintas ir kultivuojamų ląstelių gyvybingumas pasėjant kilpele iš skystos augimo terpės ant agarizuotos ir po kelių parų mikroskopu stebint, ar susiformavo kolonijos. Jei kolonijų buvo nematyti penkis persėjimus iš eilės, transformantas daugiau nebuvo persėjinėjamas. Tokia procedūra kartota iki 20 persėjimo (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Transformantų, gautų po elektroporacijos pG3-Tc/KpnI ir pG6-Tc/KpnI vektoriais, kultivavimo rezultatai iki 20 persėjimo.

Transformantas	Persėjimas („+“ – augo, „-“ – neaugo, „x“ – nebesėta)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
G3-1	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x
G3-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3-4	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-5	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-6	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-7	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-8	+	-	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-9	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x
G3-11	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x
G3-13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x
G3-14	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-15	+	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-16	+	-	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-17	+	-	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-18	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
G3-19	+	+	+	+	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

3.1. lentelės tęsinys.

G3-20	+	+	-	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G3-21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G3-22	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3-23	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G3-24	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
G3-25	+	+	+	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G3-26	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G3-27	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-1	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-2	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-3	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-5	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-6	+	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-7	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-8	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-9	+	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-10	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
G6-12	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X
G6-14	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-15	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-16	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-17	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-18	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X
G6-19	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
G6-20	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-21	+	+	+	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6-22	+	+	+	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

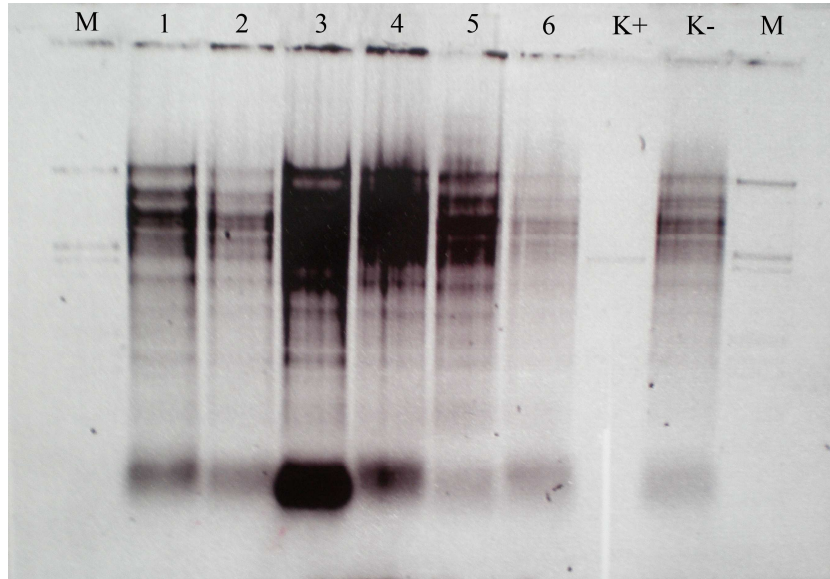
Kaip matyti iš 3.1 lentelės, didelė dalis transformantų, net 13 iš 49, neatsigavo persėti į skystą auginimo terpę nuo lėkštelės. Iš tų, kurie pradžioje skystoje terpėje augo, didžioji dalis nustodavo daugintis vėliau, ir dešimtą persėjimą buvo likę tik 7 augantys transformantai. Iki paskutinio, dvidešimtojo, persėjimo gyvybingumo neprarado viso labo 3 transformantų kultūros. Įdomu tai, kad transformantų kultūrai nustojus augti, jei būdavo tęsiami persėjimai, dažnai ji vėl atsigaudavo. Pavyzdžiui, taip nutiko G3-1 transformantui, kuris nerodė jokių gyvybingumo ženklų iki penkto persėjimo, o vėliau jo augimas išsilaikė iki pat galo. Atidžiau išsižiūrėjus į iš pirmo žvilgsnio ant agarų neaugančius transformantus kartais buvo pastebimos labai smulkios, netipinės, be įaugimo į terpę kolonijos. Tai sukėlė įtarimų, kad galbūt praradusiose augimą kultūrose įvyko vektoriaus homologinė rekombinacija į chromosominę *oriC* sritį, todėl buvo sutrikdyta DNR replikacija ir smarkiai sulėtėjo augimas. Šią hipotezę palaikė ir faktas, kad kartais po kelių persėjimų kultūros atsigaudavo ir kolonijos įgydavo įprastą morfologiją. Taip atsitiktų, jei vektorius vėl taptų laisvas ir nebetrikdytų ląstelių dauginimosi. Tikėtasi, kad šiuos įtarimus patvirtins arba išsklaidys DNR-DNR hibridizacija, kuri turėtų parodyti vektoriaus padėtį.

3.5. Vektoriaus nustatymas *M. gallinarum* transformantuose

DNR-DNR hibridizacijai atlikti reikalingas didelis DNR kiekis – bent 2 µg. Tiek DNR nėra paprasta išskirti iš mikoplazmų, tikriausiai dėl su membrana susijusių nukleazijų buvimo. Pakankamam DNR kiekiui gauti transformantų kultūros buvo persėjamos į 200 ml skystos augimo terpės ir auginamos, kol susiformuoja pakankamas biomasės kiekis, t.y. maždaug savaite. Tokie persėjimai buvo atlikti po pirmo, penkto, dešimto, penkiolikto ir dvidešimto persėjimų iš tuo metu augusių transformantų kultūrų. DNR buvo skiriama „Qiagen“ rinkiniu „Qiamp DNA Stool Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas, tik sumažinant eliuacijos tūrį, kad būtų gauta kuo koncentruotesnė DNR. Tokiu būdu pavykdavo išskirti 1,5–5 µg DNR.

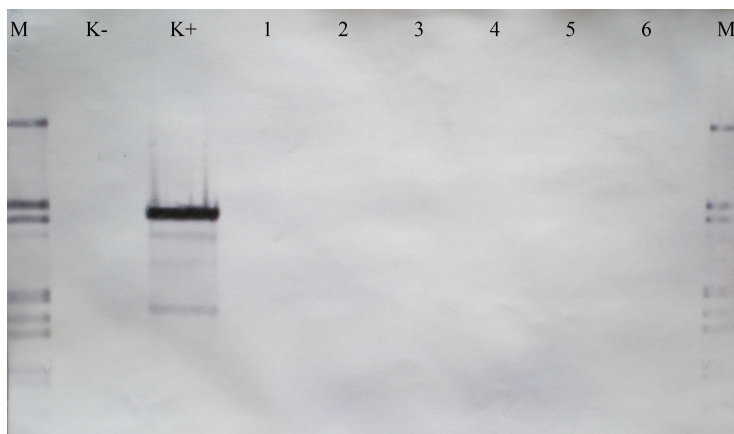
Transformantų ir netransformuotos *M. gallinarum* genomine DNR bei pG3-Tc/KpnI ir pG6-Tc/KpnI vektoriai buvo hidrolizuojami EcoRI restrikcijos endonukleaze ir išskirstomi 0,8 % agarozės gelyje elektroforezės metu (3.11 pav.). Tada DNR fragmentai buvo perkeliama ant nailoninės membranos ir hibridizuojami su zonda. Zondas – tai PGR metu padaugintas 739 bazių porų ilgio atsparumo tetraciklinui geno fragmentas. Kadangi

atsparumo tetraciklinui genas yra tik vektoriuje, pagal tai, su kokio dydžio fragmentu jungsis zondas, tikėtasi pamatyti, ar vektorius yra laisvas, ar integravęsis į genomą.



3.11 pav. Genominės DNR, hidrolizuotos EcoRI restrikcijos endonukleaze, elektroforezės nuotrauka. M žymimas molekulių masių žymuo, fragmentų dydis nuo viršaus (bp): 21226, 5148, 4973, 3530, 2027. 1–6 takeliuose – transformantų genominė DNR; K+ – pG6-Tc/KpnI vektorius; K- – netransformuotos *M. gallinarum* genominė DNR.

Visų pirma hibridizacija atlikta naudojant „Fermento“ rinkinius „Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit“ bei „Biotin Chromogenic Detection Kit“. Šioje hibridizacijos sistemoje zondas žymimas biotinu, o vėliau prie biotino jungiamas streptavidinas, prie kurio pritvirtinta šarminė fosfatazė. Zondo jungimosi su homologiška taikinio DNR seka vieta matoma šarminė fosfatazei suskaidžius chromogeninį substratą. Hibridizacijai buvo naudojama po 2 µg genominės DNR ir 20 ng vektoriaus DNR. Deja, po chromogeninės detekcijos buvo matyti tik plazmidė (3.12 pav.). Hibridizacija tokiomis pačiomis sąlygomis, tik su kitų transformantų genomine DNR, buvo pakartota dar du kartus. Rezultatai buvo tokie patys – zondas jungėsi tik su kontrolei naudojamu vektoriumi. Šiuose eksperimentuose buvo naudojama DNR, išskirta iš G3-2, G3-3, G3-10, G3-12, G3-13, G3-22 ir G6-20 transformantų po penkto persėjimo. Tai, kad zondo hibridizacija su vektoriumi vyko, rodo, kad zondas yra tinkamas vektoriumi nustatyti. Tad priežastis, kodėl nebuvo matyti juostų ties genomine transformantų DNR, galėjo būti nepakankamas chromogeninės reakcijos jautrumas.

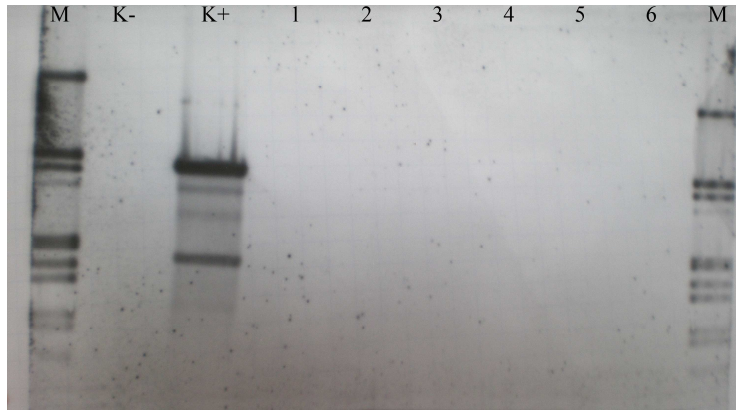


3.12 pav. DNR-DNR hibridizacijos su *tetA* geną atpažįstančiu zonu membranos nuotrauka po chromogeninės detekcijos. M žymimas molekulių masių žymuo, fragmentų dydis nuo viršaus (bp): 21226, 5148, 4973, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125. 1-6 takeliuose – transformantų genomine DNR; K+ – pG6-Tc/KpnI vektorius; K- – netransformuotos *M. gallinarum* genomine DNR.

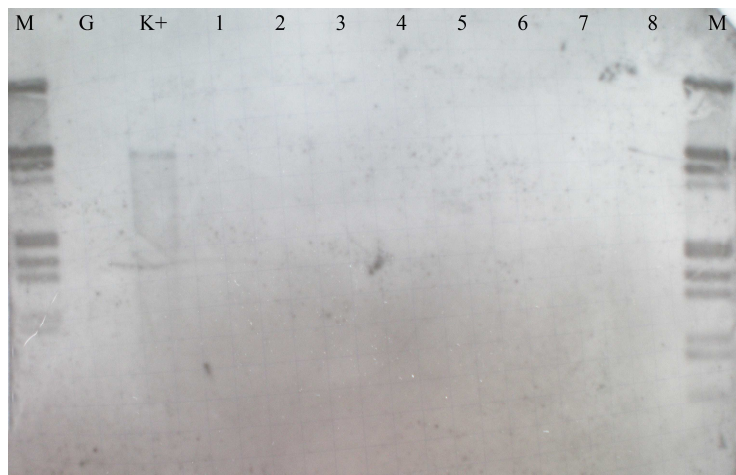
Nutarta kitus DNR-DNR hibridizacijos eksperimentus atlikti su tokia hibridizacijos sistema, kurioje detekcija vykėtų ne dėl chromogeninės, o dėl chemiluminescencinės reakcijos. Pasirinktas „Roche“ rinkinys „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“. Šioje hibridizacijos sistemoje zondas žymimas digoksigeninu, kurį vėliau atpažįsta atitinkamas antikūnas su prijungta šarmine fosfataze. Kai šis fermentas defosforilina substratą, įvyksta šviesos emisija, kuri užfiksuojama fotopopieriuje. Pirmiausia hibridizacijai naudota po 2 µg genomines DNR ir 20 ng vektoriaus DNR, tačiau gauti tokie patys rezultatai, kaip ir chromogeninės detekcijos metu (3.13 pav.). Tada genomines DNR kiekis padidintas dvigubai – iki 4 µg. Vis tiek po hibridizacijos buvo matyti tik vektorius. Šiuose eksperimentuose buvo naudojama DNR, išskirta iš G3-1, G3-2, G3-3, G3-22, G6-13 ir G6-19 transformantų po dešimto persėjimo.

Tam, kad galima būtų išsiaiškinti, ar problema yra per mažas naudojamų hibridizacijos sistemų jautrumas, ar kita, pavyzdžiui, laisvo vektoriaus praradimas DNR gryninimo metu, nutarta atlikti hibridizaciją su tuo pačiu „Roche“ „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“ rinkiniu, tik naudoti *oriC* sričiai homologišką zondą. Jis turėtų jungtis prie visų *M. gallinarum* genomines DNR pavyzdžių, nes net ir netransformuotos ląstelės turi *oriC* sritį chromosomoje. Zondas gautas PGR metu padauginus G3 *oriC* srities fragmentą ir jį pažymėjus digoksigeninu. Vėl buvo naudojama po 2 µg transformantų ir netransformuotos *M. gallinarum* genomines DNR bei 20 ng vektoriaus DNR. Gauti tokie

patys rezultatai kaip ir naudojant prie tetraciklino atsparumo geno besijungiantį zondą – ant fotopopieriaus matyti tik vektorius (3.14 pav.). Tai patvirtino, kad hibridizacijos sistemų jautrumas yra per mažas naudojamam DNR kiekiui. Šiuose eksperimentuose buvo naudojama DNR, išskirta iš G3-1, G3-3 ir G3-22 transformantų po penkiolikto persėjimo.

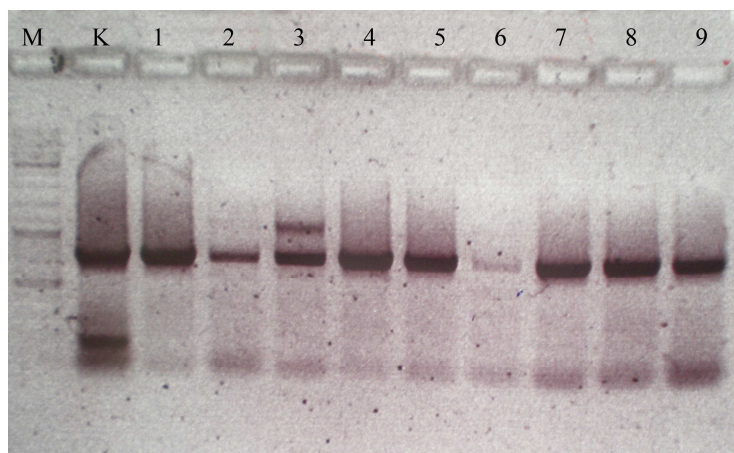


3.13 pav. DNR-DNR hibridizacijos su *tetA* geną atpažįstančiu zonu fotopopieriaus nuotrauka po chemiliuminescencinės detekcijos. M žymimas molekulinis žymuo, fragmentų dydis nuo viršaus (bp): 21226, 5148, 4973, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125. 1-6 takeliuose – transformantų genomine DNR; K+ – pG6-Tc/KpnI vektorius; K- – netransformuotos *M. gallinarum* genomine DNR.



3.14 pav. DNR-DNR hibridizacijos su *oriC* sritį atpažįstančiu zonu fotopopieriaus nuotrauka po chemiliuminescencinės detekcijos. M žymimas molekulinis žymuo, fragmentų dydis nuo viršaus (bp): 21226, 5148, 4973, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125. 1-8 takeliuose – transformantų genomine DNR; K+ – pG6-Tc/KpnI vektorius; G – netransformuotos *M. gallinarum* genomine DNR.

Pristigus jautrumo vektoriui aptikti DNR-DNR hibridizacijos būdu, reikėjo rasti kitą metodą sėkmingai transformacijai patvirtinti. Nutarta pasinaudoti pradmenimis, skirtais zondui, besijungiančiam su *tetA* genu, padauginti. Jei DNR, išskirtoje iš transformantų, yra vektorius, PGR metu bus gautas 739 bazių porų produktas. Šio metodo trūkumas tas, kad negalima nustatyti, ar vektorius yra laisvas, ar integravęsis. Reikiamo dydžio PGR produktas buvo gautas su visais „Qiamp DNA Stool Kit“ rinkiniu išskirtais transformantų DNR pavyzdžiais (3.15 pav.).

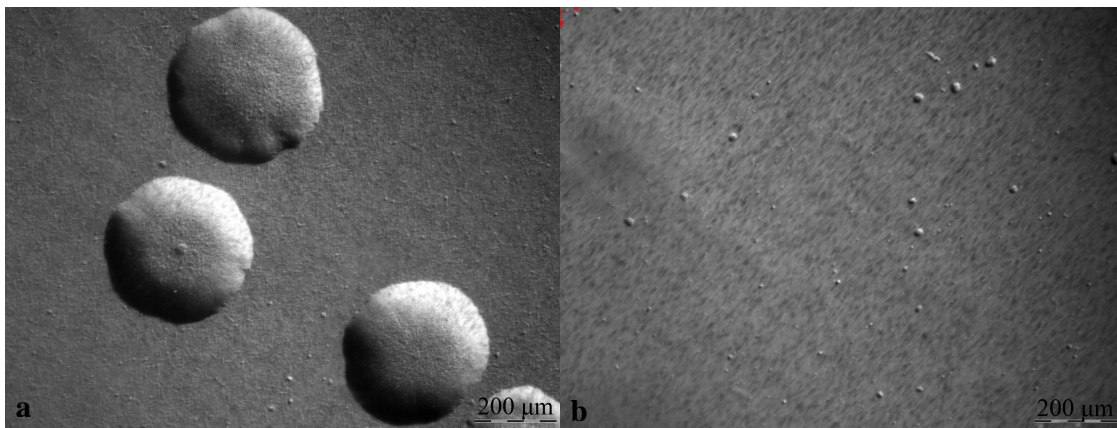


3.15 pav. PGR produktų su pradmenimis *tetA* geno fragmentui elektroforezės nuotrauka. M – žymuo, molekulinė masė (bp) nuo apačios: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 ir 10000. K – teigiama kontrolė, PGR produktas nuo p34S-Tc plazmidės; 1–9 – PGR produktas nuo transformantų genominės DNR.

PGR metodu patvirtinta, kad transformacija buvo sėkminga, tačiau nieko nesužinota apie vektoriaus padėtį ląstelėje. Kaip jau minėta anksčiau, iš transformantų kultivavimo duomenų pastebėta, kad kartais kultivuojamos kultūros augimo greitis smarkiai sumažėja ir pasikeičia ląstelių morfologija – jos tampa smulkios ir nebeįauga į terpę. Buvo kilusi hipotezė, kad šiuos pokyčius sukelia homologinė vektoriaus rekombinacija į *oriC* sritį. Be DNR-DNR hibridizacijos tiesioginio patvirtinimo gauti nepavyks, tačiau nutarta padidinti homologinės rekombinacijos tikimybę ir stebėti, ar padaugės ir netipinę morfologiją turinčių transformantų. Iš kitų darbų su *oriC* plazmidėmis žinoma, kad terpėje nesant antibiotiko plazmidės yra prarandamos (Cordova ir kt., 2002). Tad po transformacijos be antibiotiko kultivuotas ląsteles išsėjus ant terpės su antibiotiku, dalis transformantų žus, nes bus praradę

atsparumą suteikiančius vektorius, o tarp užaugusių ląstelių bus didesnė dalis turinčių į genomą integruotą vektorių.

Šiam tyrimui *M. gallinarum* buvo dar kartą transformuota pG3-Tc/KpnI ir pG6-Tc/KpnI vektoriais, o po transformacijos ląstelės buvo 4 paras gaivinamos terpėje be tetraciklinu. Po išsėjimo į lėkšteles su tetraciklinu kolonijos ėmė augti tik po 14 parų ir jų buvo mažiau – 2×10^{-7} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR. 20 kolonijų buvo persėta į 1 ml skystos augimo terpės su tetraciklinu. Po savaitės kilpele pasėjus iš skystos ant agarizuotos augimo terpės, visi pavyzdžiai suformavo netipines smulkias kolonijas (3.16 pav.). Tai tęsėsi dar kelis persėjimus, o vėliau kolonijų augimas išnyko.



3.16 pav. a Įprastos *M. gallinarum* kolonijos; **b** pakitusios morfologijos *M. gallinarum* kolonijos. Nuotraukos darytos invertuotu mikroskopu *Olympus IX 71/IX 81*.

Įprastų kolonijų skersmuo yra $\sim 420 \mu\text{m}$, o pakitusios morfologijos – $\sim 25 \mu\text{m}$. Tačiau kolonijos yra ne tik beveik 20 kartų mažesnės, bet ir auga dvigubai lėčiau. Tai galėtų paaiškinti, kodėl po kelių persėjimų kolonijų augimas išnyko. Galbūt per savaitę 1 ml augimo terpės nespėjo susiformuoti pakankamai biomasės, kad perkėlus $100 \mu\text{l}$ terpės joje liktų pakankamai ląstelių tokiam pačiam augimui. Taip po truputį kolonijų mažėjo, kol nebeliko visai.

Šie rezultatai netiesiogiai patvirtina, kad sulėtėjęs augimas ir pakitusi ląstelių morfologija yra homologinės vektoriaus rekombinacijos į *oriC* sritį požymis.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Buvo sukurti funkcionuojantys vektoriai *M. gallinarum*, turintys šios bakterijos *oriC* srities fragmentus. Iki šiol panašūs *oriC* vektoriai buvo sukonstruoti *Spiroplasma citri*, *M. mycoides*, *M. capricolum*, *M. agalactiae*, *M. pulmonis*, *M. imitans* bei *M. gallisepticum* mikoplazmoms (Lartigue ir kt., 2003; Cordova ir kt., 2002; Chopra-Dewasthaly ir kt., 2005; Lee ir kt., 2008). Klonuojant *oriC* sritį iš *M. gallinarum* genomo buvo pasinaudota filogenetiškai artimos *M. gallisepticum* pradmenimis *oriC* srities fragmentams klonuoti (Lee ir kt., 2008). Palyginus ilgiausio klonuoto fragmento seką su atitinkama *M. gallisepticum* seka, nustatytas net 99% panašumas. Be to, sutapo ir DnaA dėžučių išsidėstymo vietos. Visų anksčiau tirtų Pneumoniae filogenetinei grupei priklausančių mikoplazmų – *M. pneumoniae*, *M. imitans* ir *M. gallisepticum* – *oriC* sričių sandara tarpusavyje skyrėsi kur kas labiau: nesutapo DnaA dėžučių skaičius ir vieta bei *oriC* sričių ilgis (Lee ir kt., 2008).

Iš šešių sukonstruotų vektorių, penki, pG3-Tc/KpnI, pG3-Tc/SmaI, pG5-Tc/SmaI, pG6-Tc/KpnI ir pG6-Tc/SmaI, buvo funkcionalūs ir replikavosi *M. gallinarum* ląstelėse. Transformuojant juos cheminiu būdu, transformacijos efektyvumas priklausė nuo naudojamos PEG koncentracijos. Su 40% PEG buvo 2×10^{-7} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR, o su 50% PEG – 5×10^{-8} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR. Paveikus 70% PEG, ląstelės žuvo. Tai ne pirmasis žinomas atvejis, kai PEG yra toksiškas mikoplazmoms. *M. pneumoniae* ląstelės taip pat prarasdavo gyvybingumą paveiktos šiuo junginiu (Hedreyda ir kt., 1993). Kituose darbuose, kuriuose buvo tirtos *oriC* plazmidės mikoplazmoms, cheminės transformacijos efektyvumas buvo didesnis. *M. pulmonis* pavyko transformuoti 3×10^{-6} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR, *M. mycoides* – $1,1 \times 10^{-6}$ transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR, o *S. citri* – net 2×10^{-4} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR (Lartigue ir kt., 2003; Cordova ir kt., 2002). Tik vienos iš kelių sukurtų *M. capricolum oriC* plazmidžių cheminės transformacijos efektyvumas sutapo su gautu šiame darbe ir buvo 2×10^{-7} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR (Janis ir kt., 2005). Tiesa, visais minėtais atvejais buvo naudojamas 100 kartų didesnis DNR kiekis – ne 100 ng, o 10 μg .

Elektroporacijos efektyvumas buvo šiek tiek geresnis negu cheminės transformacijos – 6×10^{-7} transformantų/KFV/ μg plazmidinės DNR. Didinant vektoriaus DNR kiekį jo dar

labiau pagerinti nepavyko. Su 300 ng vektoriaus DNR gauta – 5×10^{-7} transformantų/KFV/ μ g plazmidinės DNR, o su 3 μ g – 1×10^{-8} transformantų/KFV/ μ g plazmidinės DNR. Kadangi sumažinus vektoriaus DNR kiekį iki 30 ng elektroporacijos efektyvumas išliko toks pats kaip ir naudojant 100 ng, kituose eksperimentuose naudota mažiau DNR. Elektroporacija buvo pasitelkta ir transformuojant filogenetiškai artimą *M. gallisepticum*. Tame eksperimente naudotas didelis DNR kiekis, 10 μ g, tačiau transformacijos efektyvumas buvo toks pats – 6×10^{-7} transformantų/KFV/ μ g plazmidinės DNR (Lee ir kt., 2008). Tuo pačiu būdu transformuojant *M. agalactiae* gauta dar mažiau transformantų – tik 2×10^{-7} transformantų/KFV/ μ g plazmidinės DNR. Pastaruoju atveju buvo naudoti 3 μ g vektoriaus DNR (Chopra-Dewasthaly ir kt., 2005).

Tarp penkių *M. gallinarum* besireplikavusių vektorių skirtumų nepastebėta, nepaisant to, kad jie skyrėsi *oriC* fragmento ilgiu ir *tetA* geno padėtimi *oriC* fragmento atžvilgiu. Su visais gautas panašus transformacijos efektyvumas ir jis vienodai skirdavosi pakeitus transformacijos metodą ar vektoriaus kiekį. Tokie patys rezultatai gauti ir su *M. gallisepticum* *oriC* plazmidėmis (Lee ir kt., 2008). Vienintelis nefunkcionavęs vektorius – pG5-Tc/KpnI. Dar prieš transformaciją buvo pastebėta, kad *oriC* srityje jis turi mutaciją. AT turtingame regione, iš karto už antros DnaA dėžutės, timino-adenino porą pakeitė citozino-guanino pora. Kadangi su šiuo vektoriumi negauta nei vieno transformanto, galima teigti, kad timino-adenino pora toje vietoje yra svarbi vektoriaus replikacijai.

Sėkminga vektorių transformacija buvo patvirtinta PGR būdu amplifikavus atsparumo tetraciklinui geno *tetA* fragmentą iš transformantų DNR. Šiuo metodu buvo patikrinti atsitiktinai atrinkti transformantai po antro, penkto, dešimto, penkiolikto ir dvidešimto persėjimo. Deja, vektoriaus padėties ląstelėje DNR-DNR hibridizacijos metodu nustatyti nepavyko. Sprendžiant iš to, kad naudojant *oriC* zondą hibridizacijos taip pat nebuvo matyti, naudotas DNR kiekis buvo per mažas. Įdomu tai, kad visuose kituose darbuose su mikoplazmų *oriC* plazmidėmis DNR-DNR hibridizacija pavyko. Tais atvejais, kai minimas naudotas DNR kiekis, jis yra 1,5–2 μ g genominės DNR, o šiame darbe buvo naudojama dvigubai daugiau – 4 μ g DNR (Janis ir kt., 2005; Cordova ir kt., 2002). Dar labiau padidinti kiekio nebuvo įmanoma dėl itin mažos DNR gryninimo išėigos.

Kultivuojant *M. gallinarum* transformantus skystoje terpėje pastebėta, kad jie vienas po kito nustoja augti. Tęsiant persėjimus, kai kurios kultūros vėl atsigauna, tačiau dauguma –

nebe. Iki dvidešimto persėjimo liko tik trys transformantų kultūros, visos transformuotos G3 *oriC* srities fragmentą turinčiu vektoriumi. Išsėti ant agarizuotos terpės nustoję augti transformantai formavo netipines smulkias kolonijas be įaugimo zonos. Kai po elektroporacijos transformuotos ląstelės keturias paras buvo kultivuojamos skystoje augimo terpėje be tetraciklino, visi vėliau iš jų atrinkti transformantai buvo tokios pačios netipinės morfologijos. Tokie rezultatai netiesiogiai liudija, kad sulėtėjusį augimą bei pakitusią morfologiją lėmė vektoriaus integracija į *oriC* sritį, nes kultivuojant ląsteles be antibiotiko buvo atrinktos ląstelės su įvykusia homologine rekombinacija ir jų savybės atitiko nustojusių augti kultivuojamų ląstelių. Taip pat transformantai su įvykusia homologine rekombinacija buvo atrinkti ir *M. pulmonis*, tik tuo atveju vektorius buvo naudotas inaktyvuoti vienam iš genų, tad integravosi į kitą genomo vietą ir jokios įtakos augimui neturėjo (Cordova ir kt., 2002).

Anksčiau sukurti *oriC* vektoriai buvo panaudoti arba genams inaktyvuoti, arba ekspresuoti (Lee ir kt., 2008; Janis ir kt., 2005; Lartigue ir kt., 2002; Cordova ir kt., 2002). Šiame darbe sukonstruoti *oriC* vektoriai galėtų būti naudojami panašioms tyrimams *M. gallinarum* ląstelėse. Tiesa, genų raiškai tirti reikėtų kuo stabilesnio vektoriaus. Tačiau genų inaktyvavimo tyrimuose integracija į *oriC* sritį neturėtų vykti, nes vektorius integruotųsi į tą vietą chromosomoje, kurioje yra inaktyvuojamas genas. Dėl ypač didelio *oriC* srities sekų panašumo su *M. gallisepticum*, sukurti vektoriai greičiausiai replikuotųsi ir pastarosios bakterijos ląstelėse.

IŠVADOS

1. *M. gallinarum* ląstelėse replikavosi penki vektoriai: pG3-Tc/KpnI, pG3-Tc/SmaI, pG5-Tc/SmaI, pG6-Tc/KpnI ir pG6-Tc/SmaI.
2. Nustatyta dalies *M. gallinarum oriC* srities nukleotidų seka, labai panaši į *M. gallispeticum oriC* nukleotidų seką.
3. Panaudojus cheminės transformacijos ir elektroporacijos metodus pirmą kartą transformuota *M. gallinarum*.
4. DNR-DNR hibridizacija nebuvo pakankamai jautrus metodas vektoriaus padėčiai ląstelėje nustatyti.

OriC* vektorių kūrimas *Mycoplasma gallinarum

Santrauka

Mikoplazmų tyrimus apsunkina genetinių įrankių trūkumas. Ne išimtis ir *Mycoplasma gallinarum* – platų šeimininkų ratą turinti silpno patogeniškumo bakterija. Šiame darbe aprašomas pirmųjų *M. gallinarum* skirtų vektorių, į kurių sudėtį įeina chromosominė replikacijos pradžios sritis (*oriC*), kūrimas. Be to, šio tyrimo metu pirmą kartą pademonstruota sėkminga šios mikoplazmų rūšies transformacija. Iš šešių sukonstruotų vektorių penki replikavosi *M. gallinarum* ląstelėse, o šeštasis nebuvo funkcionalus dėl AT turtingoje srityje pasroviui nuo antrosios DnaA dėžutės atsiradusios mutacijos. Kai kurie vektoriai, kultivuojant transformantus *in vitro*, integravosi į chromosomą. Homologinės rekombinacijos dažnis dar labiau padidėjo po transformacijos ilgą laiką gaivinant ląsteles augimo terpėje be antibiotiko. Sukurti *oriC* vektoriai galėtų būti naudojami genetiniams *M. gallinarum* tyrimams, ypač genams inaktyvuoti ir ekspresuoti, bei suteiktų daugiau žinių apie molekulinę šios bakterijos savybes.

Development of *oriC* vectors for *Mycoplasma gallinarum*

Summary

Genetic studies of mycoplasmas are limited by the lack of a replicable vector system. *Mycoplasma gallinarum*, an opportunistic pathogen having a wide range of hosts, is not the exception. This study describes the identification and cloning of the *M. gallinarum* origin of replication (*oriC*) in order to construct the first vectors for this species. Additionally, this report provides the first evidence of the successful transformation of *M. gallinarum*. Five out of six developed vectors have been functional. The replication of the sixth vector has not been supported due to the mutation in the AT rich region downstream the second DnaA box. During *in vitro* passages, some vectors have been integrated into the chromosome. The rate of chromosomal integration has been even further increased by the lack of antimicrobial selection pressure during cultivation. Hence developed *oriC* plasmids are useful for genetic studies, including inactivation or expression of selected genes, in *M. gallinarum*, and lead to a better understanding of its molecular biology.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Amikam D, Glaser G, Razin S. Mycoplasmas (mollicutes) have a low number of rRNA genes. *J. Bacteriol.* 1984; **158**: 376-378.
2. Artiushin S, Duvall M, Minion F. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma* strain *ism1499* and its assignment to the *Acholeplasma oculi* strain cluster. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; **45**: 104-109.
3. Baseman J, Tully J. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging and burdened by their notoriety. *Emerging Infect. Dis.* 1997; **3**: 21-33.
4. Bencina D, Dorrer D, Tadina T. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. *Avian. Pathol.* 1987; **16**: 653-664.
5. Bencina D, Svetlin A, Dorrer D, Tadina-Jaksic T. Humoral and local antibodies in chickens with mixed infection with three *Mycoplasma* species. *Avian Pathol.* 1991; **20**: 325-334.
6. Bergemann A, Whitley J, Finch L. Homology of *Mycoplasma* plasmid pABD201 and staphylococcal plasmid pE194. *J. Bacteriol.* 1989; **171**: 593-595.
7. Bi W, Stambrook P. CCR: a rapid and simple approach for mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 2949-2951.
8. Breton M, Duret S, Arricau-Bouvery N, Beven L, Renaudin J. Characterizing the replication and stability regions of *Spiroplasma citri* plasmids identifies a novel replication protein and expands the genetic toolbox for plant-pathogenic spiroplasmas. *Microbiology.* 2008; **154**: 3232-3244.
9. Brown D, Farmerie W, May M, Benders G, Durkin A, Hlavinka K, Hostetler J, Jackson J, Johnson J, Miller R, Paralanov V, Radune D, Szczypinski B, Glass J. Genome sequences of *Mycoplasma alligatoris* a21jp2 and *Mycoplasma crocodyli* mp145. *J. Bacteriol.* 2011; **193**: 2892-2893.
10. Cao J, Kapke P, Minion F. Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with Tn916, Tn4001 and integrative plasmid vectors. *J. Bacteriol.* 1994; **176**: 4459-4462.
11. Chopra-Dewasthaly R, Marnda M, Rosengarten R, Jechlinger W, Citti C. Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; **253**: 89-94.
12. Chow V, Hawkey P, Chan E, Chin M, Au T, Fung D, Chan R. High-level gentamicin resistance mediated by a Tn4001-like transposon in seven nonclonal hospital isolates of *Streptococcus pasteurianus*. *Antimicrob. Agents Ch.* 2007; **51**: 2508-2513.
13. Cordova C, Lartigue C, Sirand-Pugnet P, Renaudin J, Cunha R, Blanchard A. Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in *oriC* replicative plasmids. *J. Bacteriol.* 2002; **184**: 5426-5435.
14. Courvalin P, Trieu-Cuot P. Minimizing potential resistance: the molecular view. *Clin. Infect. Dis.* 2001; **33**: 138-146.
15. Dennis J, Zylstra G. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; **64**: 2710-2715.
16. Dickinson M, Townsend R. Lysogenisation of *Spiroplasma citri* by a type 3 spiroplasmavirus. *Virology.* 1985; **146**: 102-110.

17. Dybvig K, Maniloff J. Integration and lysogeny by an enveloped *Mycoplasma* virus. *J. Gen. Virol.* 1983; **64**: 1781-1785.
18. Dybvig K, Voelker L. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.* 1996; **50**: 25-57.
19. Dybvig K, Woodard A. Construction of *recA* mutants of *Acholeplasma laidlawii* by insertional inactivation with a homologous DNA fragment. *Plasmid.* 1992; **28**: 262-266.
20. Gibson D, Benders G, Andrews-Pfannkoch, Denisova E, Baden-Tillson H, Zaveri J, Stockwell T, Brownley A, Thomas D, Algire M, Merryman C, Young L, Noskov V, Glass J, Venter J, Hutchinson C, Smith H. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science.* 2008; **319**: 1215-1220.
21. Gil R, Silva F, Pereto J, Moya A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; **68**: 518-537.
22. Glass J, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis M, Maruf M, Hutchinson C, Smith H, Venter J. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006; **103**: 425-430.
23. Gruss A, Ehrlich S. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid families. *Microbiol. Rev.* 1989; **53**: 231-241.
24. Halbedel S, Stulke J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007; **297**: 37-44.
25. Hames C, Halbedel S, Schilling O, Stulke J. MMR: a method for the simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; **71**: 4097-4100.
26. Hedreyda C, Lee K, Krause D. Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation. *Plasmid.* 1993; **30**: 170-175.
27. von Heinje G. The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 1990; **115**: 195-201.
28. Janis C, Lartigue C, Frey J, Wroblewski H, Thiaucourt F, Blanchard A, Sirand-Pugnet P. Versatile use of *oriC* plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subs. *capricolum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; **71**: 2888-2893.
29. King K, Dybvig K. Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid.* 1992; **28**: 86-91.
30. King K, Dybvig K. Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMK1. *Plasmid.* 1993; **31**: 49-59.
31. Lartigue C, Blanchard A, Renaudin J, Thiaucourt F, Sirand-Pugnet P. Host specificity of mollicutes *oriC* plasmids: functional analysis of replication origin. *Nucleic Acids Res.* 2003; **31**: 6610-6618.
32. Lartigue C, Duret S, Garnier M, Renaudin J. New plasmid vectors for specific gene targeting in *Spiroplasma citri*. *Plasmid.* 2002; **48**: 149-159.
33. Lartigue C, Glass J, Alperovich N, Pieper R, Parmar P, Hutchinson C, Smith H, Venter J. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science.* 2007; **317**: 463-468.
34. Lee S, Browning G, Markham P. Development of a replicable *oriC* plasmid for *Mycoplasma galisepticum* and *Mycoplasma imitans*, and gene disruption through homologous recombination in *M. galisepticum*. *Microbiol.* 2008; **154**: 2571-2580.
35. Leigh S, Evans J. Detection of *Mycoplasma gallinarum* by real-time PCR. *Int. J. Poult. Sci.* 2009; **8**: 108-111.

36. Ludwig W, Euzeby J, Whitman W. Road map of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2011.
37. Mahairas M, Minion F. Transformation of *Mycoplasma pulmonis*: demonstration of homologous recombination, introduction of cloned genes, and preliminary description of an integrating shuttle system. *J. Bacteriol.* 1989; **171**: 1775-1780.
38. Marais A, Bove J, Renaudin J. Spiroplasma citri virus SPV1-derived cloning vector: deletion formation by illegitimate and homologous recombination in a spiroplasmal host strain which probably lacks a functional *recA* gene. *J. Bacteriol.* 1996; **178**: 862-870.
39. Mead D, Skorupa E, Kemper B. Single stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Prot. Engin.* 1986; **1**: 67-74.
40. Messer W. The bacterial replication initiator *dnaA*. *DnaA* and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002; **26**: 355-374.
41. Miles R. Catabolism in *Mollicutes*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; **138**: 1773-1783.
42. Minion F, Jarvill-Taylor K, Billigs D, Tigges E. Membrane associated nuclease activities in *Mycoplasmas*. *J. Bacteriol.* 1993; **175**: 7842-7847.
43. Minion F, Kapke P. *Mycoplasma* protocols. Humana Press, 1998.
44. Miyata M, Seto S. Cell reproduction cycle of *Mycoplasma*. *Biochimie.* 1999; **81**: 873-878.
45. Musatovova O, Dhandayuthapani S, Baseman J. Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, *Mycoplasma genitalium*. *J. Bacteriol.* 2006; **188**: 2845-2855.
46. Mushegian A, Koonin E. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; **93**: 10268-10273.
47. Nystrom S, Wieslander A. Isoprenoid modification of proteins distinct from membrane acyl proteins in prokaryote *Acholeplasma laidlawii*. *BBA-biomembranes* 1992; **1107**: 39-43.
48. Rechnitzer H, Brzuszkiewicz E, Strittmatter A, Liesegang H, Lysnyansky I, Daniel R, Gottschalk G, Rottem S. Genomic features and insights into the biology of *Mycoplasma fermentans*. *Microbiol.* 2011; **157**: 760-773.
49. Renaudin J, Marais A, Verdin E, Duret S, Foissac X, Laigret F, Bove J. Integrative and free *Spiroplasma citri oriC* plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*. *J. Bacteriol.* 1995; **177**: 2870-2877.
50. Robino P, Alberti A, Pittau M, Chessa B, Miciletta M, Nebbia P, Le Grand D, Rosati S. Genetic and antigenetic characterization of the surface lipoprotein p48 of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* 2005; **109**: 201-209.
51. Sambrook J, Fritch E, Maniatis T. Molecular cloning - a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press.* 1989.
52. Shah-Majid M. Effect of mixed infection of *Mycoplasma gallinarum* and Newcastle disease virus (f-strain) on the tracheal epithelium of village chickens. *Res. Vet. Sci.* 1996; **61**: 176-178.
53. Sharma R, Schimke R. The propensity for gene amplification: a comparison of protocols, cell lines, and selection agents. *Mutat. Res.* 1994; **304**: 243-260.

54. Smiley B, Minion F. Enhanced readthrough of opal (UGA) stop codons and production of *Mycoplasma pneumoniae* p1 epitopes in *E. coli*. *Gene*. 1993; **134**: 33-40.
55. Stamburski C, Renaudin J, Bove J. First steps towards a virus-derived vector for gene cloning and expression in spiroplasmas, organisms which read UGA as a tryptophan codon: synthesis of chloramphenicol acetyltransferase in *Spiroplasma citri*. *J. Bacteriol.* 1991; **173**: 2225-2230.
56. Tamames J, Gil R, Latorre A, Pereto J, Silva F, Moya A. The frontier between cell and organelle: genome analysis of Candidatus *Carsonella ruddii*. *BMS Evol. Biol.* 2007; **7**: 1-7.
57. Vysniauskis G, Dumalakiene I, Jonauskiene I. Detection of antigenic variation among strains of poultry *Mycoplasma* by immunoblot analysis. *Centr. Eur. J. Immunol.* 2010; **35**: 207-213.
58. Wan X, Branton A, Hanson L, Pharr G. Identification and initial characterization of a putative *Mycoplasma gallinarum* leucine aminopeptidase gene. *Curr. Microbiol.* 2004; **48**: 32-38.
59. Waters E, Hohn M, Ahel I, Graham D, Adams M, Barnstead M, Beeson K, Bibbs L. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; **100**: 12984-12988.
60. Westberg J, Persson A, Holberg A, Goesmann A, Lundeberg J. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* SC type strain pg1t, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.* 2004; **14**: 221-227.
61. Williams M, Pollack J. A *Mollicute* (*Mycoplasma*) DNA repair enzyme: purification and characterization of uracil-DNA glycosylase. *J. Bacteriol.* 1990; **172**: 2979-2985.
62. Wolf M, Muller T, Dandekar T, Pollack J. Phylogeny of *Firmicutes* with special reference to *Mycoplasma* (*Mollicutes*) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004; **54**: 871-875.
63. Zuo L, Wu Y, You X. *Mycoplasma* lipoproteins and toll-like receptors. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2009; **10**: 67-76.