

Využitie bakteriofága P1 pri in vivo klonovaní

MARIÁN MAČOR - MIRIAM VIZVÁRYOVÁ - JÁN TURŇA

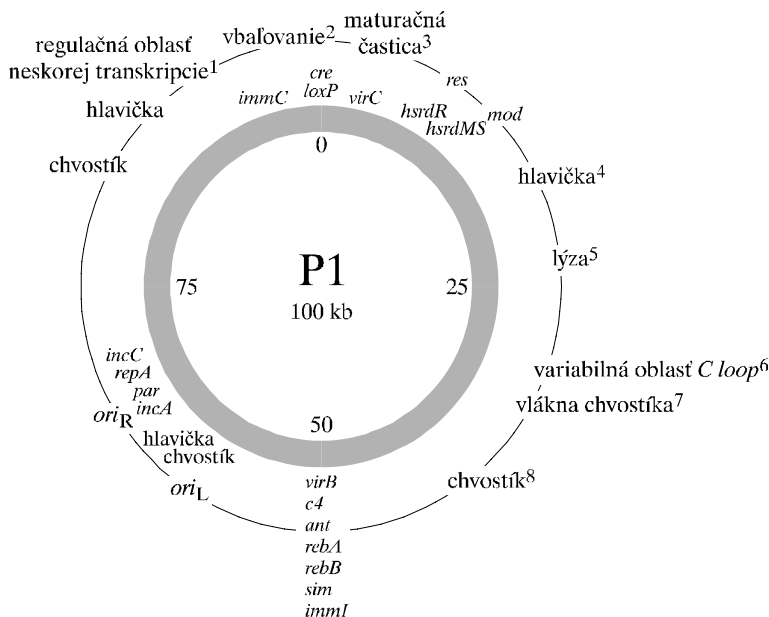
SÚHRN. Bakteriofág P1 bol použitý pre prenos génov tetracyklínovej a kanamycínovej rezistencie v bunkách *Escherichia coli*. Tým bolo poukázané na skutočnosť, že bakteriofág P1 môže byť využitý ako účinný nástroj pri konštrukcii bakteriálnych kmeňov s novými vlastnosťami.

Bakteriofág P1 bol jedným z troch fágov izolovaných v r. 1951 z lyzogénneho kmeňa *Escherichia coli* Bertanim [1]. Genóm teplotne indukovateľného bakteriofága P1 s kruhovou dvojvláknovou DNA má veľkosť okolo 100 kbp a môže kódovať asi 100 génov (obr. 1.). Bakteriofág P1 má široké uplatnenie a využíva sa ako trasdukčný fág. S úspechom sa použil napr. pri štúdiu rekombinácie, replikácie plazmidovej DNA, pri udržiavaní plazmidov v bunke, pri štúdiu regulačných mechanizmov, vbaľovacích procesov, lytického cyklu a pod. [2].

Bakteriofág P1 sa líši od iných temperovaných fágov v tom, že sa neintegruje do chromozómu, ale je vo forme plazmidu. Chová sa ako nízkokópiový plazmid s prísnou kontrolou replikácie a prerozdeľovania kópií do dcérskych buniek (1 až 2 kópie na bakteriálny chromozóm) [3].

Celý genóm bakteriofága P1 je dobre preštudovaný tak v štádiu profága, ako aj jeho vegetatívne funkcie. Linearizácia fága P1 nastáva v mieste *LoxP*. Gény zodpovedné za tvorbu hlavičky sú lokalizované v troch oblastiach a gény zodpovedné za tvorbu chvostíkových fibríl (tail fibers) sú až v štyroch oblastiach. Tým sa organizácia génov fága P1 líši od iných známych fágov ako je bakteriofág lambda, kde sú tieto gény sústredené na jednom mieste (gene cluster). Z ďalších významných génov bakteriofága P1 treba spomenúť gény zodpovedné za lytický cyklus (*wir* a *clear*), za vbaľovanie (*pac*), regulačné gény (*bof*, *ant*, *coi*, *sim*, *C4*, *ban*, *ant/reb*), gény zodpovedné za špecifickú

RNDr. Marián MAČOR, CSc., Mgr. Miriam VIZVÁRYOVÁ, Doc. RNDr. Ján TURŇA, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.



OBR. 1. Génova mapa bakteriofága P1.

FIG. 1. Gene map of bacteriophage P1.

1 - regulation of late transcription, 2 - packaging, 3 - maturation particle, 4 - head, 5 - lysis, 6 - invertible region, 7 - tail fibers, 8 - tail.

výberu hostiteľa (*C loop*), gény zodpovedné za segregáciu (*loxP* a *cre*), gény zodpovedné za prerozdelenie (*par*) a inkompatibilitu (*incA*, *incB*, *incC*) [2]. Determinanty zodpovedné za imunitu bakteriofága sú na genóme rozložené v troch oddelených oblastiach *immT*, *immI* a *immC*.

Bakteriofág P1 má vlastný restriktčno-modifikačný systém (RMS). P1 genóm kóduje dva miestne špecifické rekombinačné systémy, ktoré hrajú významnú úlohu v životnom cykle bakteriofága P1. Okrem toho P1 nesie kópiu inzerčného elementu IS1. Miestne špecifický rekombinačný systém využíva miesto *LoxP* a *cre*.

Lytické funkcie bakteriofága sú potlačené represorom (bielkovina *gpc1*), ktorý je kódovaný fágovou DNA. Funkcia represora je pod kontrolou štyroch ďalších génov bakteriofága P1. Replikácia fága P1 počas lytického cyklu je kontrolovaná inými mechanizmami ako replikácia P1 v štádiu profága.

Bakteriofág P1 vbaľuje svoju DNA do fágovej hlavičky od miesta *pac* mechanizmom plnej hlavičky (headful mechanism). Proces vbaľovania pre-

bieha jedným smerom. Účinná transdukcia sa dosiahne infekčným bakteriofágovým lyzátom donorového kmeňa do recipientného kmeňa. P1 transdukujúce častice strácajú fágovú DNA a nesú namiesto nej fragmenty bakteriálneho chromozómu až do veľkosti fágovej DNA [1-6].

P1 lyzáty obsahujú častice fága 18 nm široké, 210 nm dlhé s ikosaedrálou hlavičkou obsahujúcou rôzne veľké molekuly DNA. U divokého kmeňa P1 bolo zistené takéto rozloženie fágových častíc: veľké (priemer 85 nm) 70 - 94 %, stredne veľké (priemer 65 nm) 6 - 27 % a malé (priemer 47 nm) 0,2 - 4 %. Virióny s veľkou hlavičkou (priemer 85 nm) predstavujú väčšinu fágových častíc, čo závisí od genotypu fága P1 a od druhu hostiteľa. Na hlavičku fága P1 sa upína šesť kontraktilných chvostíkových fibríl, ktoré ako receptor rozoznávajú lipopolysacharidy [1,2,7,8]. Jedna z $3 \cdot 10^3$ až 10^5 P1 fágových častíc obsahuje do 100 kb cudzorodej DNA a reprezentuje časticu transdukčného fága. Fágová hlavička je zložená z jedného hlavného proteínu a zo 14 ďalších proteínov. Hlavný proteín a 7 ďalších proteínov vytvára štruktúru chvostíka.

Gény *LoxP* a *cre* sú zodpovedné za segregáciu profága počas bunkového delenia, pričom je pozoruhodná výnimočná presnosť, s ktorou segregácia prebieha a to jedna bunka bez fága na desaťtisíc delení. Zásah do *cre-Lox* systému má zvyčajne za následok vznik dimérnych foriem fága P1, ktoré sa vyriedujú oveľa rýchlejšie [1-5]. P1 bakteriofág sa zriedka integruje do bakteriálneho chromozómu, avšak prechodne sa môže integrovať s vysokou účinnosťou, ak chromozóm obsahuje *LoxP* miesta. Táto rekombinácia je však reverzibilná a k stabilnej integrácii nedochádza. *LoxP* miesto môže rekombinovať aj s miestom *LoxB* na chromozóme hostiteľa, ale účinnosť takejto rekombinácie je rádovo nižšia. Cre proteín (gpcre) je pre *Lox* rekombináciu nevyhnutný. Najakceptovanejšie vysvetlenie je, že tento proteín funguje ako topoizomeráza, ktorá môže rozpájať molekuly DNA po rekombinácii [2]. Tvorba kointegrátov s chromozómom hostiteľa môže byť v dôsledku aktivity IS1 elementu. Homologická rekombinácia medzi rôznymi kópiami IS1 je oveľa častejšia než integrácia sprostredkovaná transpozičnou funkciou IS1. Dôsledkom takejto rekombinácie môže byť prenos hostiteľskej DNA ohraničenej IS1 elementami. Produkt génu *cin* tu pôsobí ako rekombinačný enhancer [1].

Podobne ako u fága Mu G segment aj fág P1 obsahuje oblasť, ktorá určuje špecifickosť výberu hostiteľa. Tento úsek DNA je tvorený unikátnou sekvenciou veľkou 3 kb koncovými opakujúcimi sa sekvenciami dlhými asi 620 bp. Táto oblasť DNA kóduje dve sady chvostíkových fibríl a zmena orientácie umožňuje fágu P1 alternatívne meniť okruh hostiteľov. V závislosti od orientácie segmentu je exprimovaná iba príslušná skupina génov P1 fágového seg-

mentu *C loop*. Fág P1 sa prichytáva svojimi chvostíkovými fibrilami na receptory hostiteľských buniek, ktorými môže byť glukóza, alebo galaktóza vo vonkajšej lipopolysacharidovej membráne hostiteľskej bunky. Fág P1 má široké spektrum hostiteľov medzi gramnegatívnymi baktériami. Infekčné fágy majú orientáciu *C loop* segmentu na 99 % v jednom smere (C⁺), ale v stave lyzogénov majú približne 50 % v oboch smeroch (C⁺ aj C⁻) [1-3].

P1 v stave profága má rovnakú funkčnú organizáciu replikónu a stratégiu regulácie replikácie ako plazmid F. Nie je konjugatívny, ale je mobilizovateľný inými konjugatívnymi plazmidami.

Replikácia DNA bakteriofága P1 začína na jednom z dvoch replikónov *ori_R* a *ori_L*. DNA P1 v štádiu profága sa replikuje z *ori_R*. Gén *repA* kóduje inicičný proteín *dnaA*, ktorý je nevyhnutný pre *ori_R* replikáciu [1,2].

Pri transdukcii P1 fágom sa prenáša nefágová genetická informácia do buniek príjemcu infekčnými transdukujúcimi časticami. Tieto častice pritom reprezentujú asi 0,3 % celkových fágových častíc. Boli izolované mutanty P1 fága s 10 násobne vyššou transdukčnou schopnosťou [4,8,9].

Množstvo DNA, ktoré môže fág preniesť je obmedzené iba vbaľovacou kapacitou hlavičky bakteriofága P1 bez ohľadu na jej pôvod. Boli vyvinuté P1 klonovacie systémy schopné prenášať 100 kb veľké fragmenty DNA [6]. Nevyhnutné pre vbaľovanie DNA je *pac* vbaľovacie miesto, ktoré je nutné pre začatie vbaľovacieho procesu. Ďalej sú potrebné dve *LoxP* rekombinačné miesta ohraničujúce klonovaný inzert cudzorodej DNA, pretože tieto zabezpečia cyklizáciu vbaľovanej lineárnej DNA po fágovej infekcii buniek. Ďalej musí byť prítomná fágová *cre* rekombináza. Cyklizácia je nevyhnutná pre reprodukciu a uchovávanie vektora P1 vo forme plazmidu. Veľkosť vbaľovanej DNA je limitovaná iba kapacitou fágovej hlavičky a cudzorodý fragment je potom ohraničený dvomi *LoxP* miestami. Ak sa medzi dve *LoxP* miesta naviaže úsek DNA väčší ako 100 kbp nemôže cyklizovať, pretože po vbalení do hlavičky fága P1 by obsahovala iba jedno *LoxP* miesto. 100 kbp je teda limitovaná veľkosť pre klonované fragmenty [4,6]. Napriek tomuto obmedzeniu takéto veľké fragmenty DNA sú dvakrát väčšie ako fragmenty, ktoré možno klonovať v kozmidoch.

P1 bakteriofág je jedným zo série všeobecne transdukujúcich fágov medzi ktoré patria P22, T1, T4, Mu, KB1, ES18 a pod. Tieto fágy boli úspešne využité pre genetické a komplementačné mapovanie génov, pri štúdiách homológie génov a najmä pri konštrukcii nových bakteriálnych kmeňov [4].

Materiál a metódy

Postup prípravy fágového lyzátu P1

Pri príprave fágového lyzátu sme vychádzali z jednej kolónie donorovej bunky kultivovanej za intenzívneho prevzdušňovania pri optimálnych podmienkach (28 - 37 °C) cez noc. Bunkami sme inokulovali LB médium s 0,2 % glukózou, 10 mmol.l⁻¹ MgCl₂ a 5 mmol.l⁻¹ CaCl₂ a po 30 minútach kultivácie pri 37 °C sme pridali P1 fágový lyzát (s titrom 10¹⁰ pfu.ml⁻¹), zvýšili teplotu na 40 až 42 °C a kultivovali 3 až 4 h. Po úplnej lýze buniek sme k lyzátu pridali niekoľko kvapiek chloroformu a nelyzované bunky sme oddelili centrifugáciou. Na preverenie lyzátu sme stanovili titer, pričom vhodný lyzát mal titer vyšší ako 10¹⁰. Pripravený lyzát sme používali na transdukciu a uchovávali v chladničke s vedomím, že jeho titer klesne mesačne o jeden rád.

Postup transdukcie s P1 lyzátom

Pri prenose génu, alebo skupiny génov v operóne z donorových buniek do buniek recipientných sme k bunkám pridali fágový lyzát s rôznou koncentráciou a bunky inkubovali vo vodnom kúpeli 90 min pri teplote 28 °C. Pridali sme 10 mmol.l⁻¹ citronan sodný a päťtinu objemu LB média a kultivovali 1 až 2 h pri 28 °C. Bunky sme rozsievali na pevné kultivačné médiá s príslušným selekčným markerom (antibiotiká, sacharidy, aminokyseliny a pod.). Vyrastené kolónie sme testovali na prítomnosť sledovaného markera.

Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene použité v experimentálnej práci sú uvedené v tabuľke 1. Pri kultivácii sme do LB kultivačného média [10] pridávali antibiotiká do koncentrácie: ampicilín 5 µg.ml⁻¹, kanamycín 25 µg.ml⁻¹, tetracyklín 30 µg.ml⁻¹.

Výsledky a diskusia

Bakteriofág P1 pre transdukciu v bunkách *E. coli* popísal prvýkrát Lennox v roku 1955 pre generalizovanú transdukciu chromozomálnych génov medzi kmeňmi *Escherichia coli* a *Shigella* [11]. Odvtedy bolo urobených množstvo experimentov s využitím fága P1 pre prenos väčších fragmentov DNA, ako to umožňuje bakteriofág lambda (45 - 48 kb), aj keď nie tak veľkých, ako prenášajú YAC klonovacie vektory (200 až 800 kb DNA) [6].

TABUĽKA 1. Použité bakteriálne kmene.

TABLE 1. Used bacterial strains.

| Baktérie ¹ | Genotyp ² | Citácia ³ |
|-----------------------|--|----------------------|
| <i>E. coli</i> K12 | divý typ | [12] |
| <i>E. coli</i> TG1 | K12 (lac-pro) SupE, thi, hsd05, F ⁻ , traD36, proAB, lacI ^q , ZΔM15 | [13] |
| <i>E. coli</i> MC4100 | arg Δ139, Δ(ara F lac), U169, rpsL150, (str ^r), relA1, fibB5301, deoC1, pstF25, rbsR | [13] |
| <i>E. coli</i> JT4 | TG1 Δfnr, <i>Mucts62</i> , Tc, Cm | [14] |
| <i>E. coli</i> MM4100 | <i>E. coli</i> MC4100, Tc | |
| <i>E. coli</i> MM12 | <i>E. coli</i> K12, Km | |
| <i>E. coli</i> MM4101 | <i>E. coli</i> MC4100, Km, Tc | |
| <i>E. coli</i> JT24 | PC2, (sdh ⁻ , Δfrd, Δfnr), Kn, Tc, Sm | [14] |
| <i>E. coli</i> MI1443 | <i>E. coli</i> MM383 ΔfrdACBD ΔampC polA ⁺ | [15] |
| <i>E. coli</i> MM121 | <i>E. coli</i> MM383 ΔfrdACBD ΔampC polA ⁺ Tc | |
| Bakteriofág P1 | P1 cam P1: Tn9, clr-100 | [16] |

1 - bacteria, 2 - genotype, 3 - references.

P1 transdukčný systém sme úspešne využili okrem iného aj pri štúdiu funkcie oxidoredukčných enzýmov *sdh* (sukcinát dehydrogenáza) a *frd* (fumarát reduktáza), ktoré katalyzujú premenu fumarátu na sukcinát a opačne v Krebsovom cykle (nepublikované výsledky). Pri prenose *sdh* génu sa využila vlastnosť integrovaného Tn5 transpozónu do študovaného génu, čo okrem jeho značenia gén aj inaktivovalo. P1 transdukciou sme do systému vniesli gén pre rezistenciu voči tetracyklínu. Sledovali sme stupeň väzby medzi týmito dvomi génmi. Po následnej P1 transdukcii sme seletovali klony s väzbovosťou 73, 89, 92 a 98 % (90 % väzbovosť zodpovedá 5 kb na chromozóme *E. coli*). Je pozoruhodné, že P1 transdukcia fungovala nielen medzi jednotlivými druhmi *E. coli* (tabuľka 2. a 3.), ale aj medzi *E. coli* a bakteriálnymi rodmi *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia* a *Shigella*. Využitie markerov pre príslušnú rezistenciu voči antibiotikám je veľmi výhodné pre detekciu, ako aj pre selektovanie klonov prenášaných P1 transdukciou.

Transdukciu P1 bakteriofágom sme úspešne využili pri prenose génov zodpovedných za využitie sacharózy ako zdroja uhlíka (sacharázový operón). Enterobaktérie za normálnych okolností nie sú schopné fermentovať sacharózu. Boli popísané kmene, ktoré takúto schopnosť nadobudli po získaní plazmidu, ktorý nesie sacharázový operón [17]. Prenos sacharázového operónu sa uskutočnil nielen konjugáciou, ale aj využitím mini-Mu derivátov

TABULKA 2. P1 transdukčný prenos génu tetracyklínovej rezistencie.

TABLE 2. P1 transduction transfer of tetracycline resistance gene.

| Donor ¹ | Recipient ² | FLP1 ^a : recipient ³ | Počet transduktantov ^{b 4} |
|-----------------------|------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> JT24 | <i>E. coli</i> MC4100 | 1:1 | 1,37.10 ⁴ |
| | | 2:1 | 9,15.10 ³ |
| | | 4:1 | 7,05.10 ³ |
| <i>E. coli</i> MM4100 | <i>E. coli</i> TG1 | 1:1 | 1,23.10 ⁴ |
| | | 2:1 | 1,54.10 ⁴ |
| | | 4:1 | 1,11.10 ⁴ |
| <i>E. coli</i> MM4100 | <i>E. coli</i> MC4100 | 1:1 | 3,11.10 ⁵ |
| | | 2:1 | 4,23.10 ⁴ |
| | | 4:1 | 2,12.10 ⁴ |

a - FLP1 - fágový lyzát P1 z donora, b - počet kolónií pozitívnych transduktantov prepočítaný na 1 ml transdukčnej zmesi. Čísla predstavujú priemer z piatich nezávislých experimentov.

1 - donor, 2 - recipient, 3 - FLP1^a: recipient, 4 - number of transductants^b, a - phage lysate from donor, b - number of positive transductants colonies per 1 ml of transductant mixture. Numbers represent average values from five independent experiments.

TABULKA 3. P1 transdukčný prenos génu kanamycínovej rezistencie.

TABLE 3. P1 transduction transfer of kanamycin resistance gene.

| Donor ¹ | Recipient ² | FLP1 ^a : recipient ³ | Počet transduktantov ^{b 4} |
|-----------------------|------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> MM12 | <i>E. coli</i> MC4100 | 1:1 | 9,22.10 ⁴ |
| | | 2:1 | 9,88.10 ⁴ |
| | | 4:1 | 7,42.10 ⁴ |
| <i>E. coli</i> MM12 | <i>E. coli</i> TG1 | 1:1 | 1,32.10 ⁵ |
| | | 2:1 | 1,01.10 ⁵ |
| | | 4:1 | 8,90.10 ⁴ |
| <i>E. coli</i> MM4101 | <i>E. coli</i> MC4100 | 1:1 | 6,35.10 ⁴ * |
| | | 2:1 | 4,12.10 ⁴ * |
| | | 4:1 | 3,19.10 ³ * |

a - FLP1 - fágový lyzát P1 z donora, b - počet kolónií pozitívnych transduktantov prepočítaný na 1 ml transdukčnej zmesi. Čísla predstavujú priemer z piatich nezávislých experimentov, * - prenos obidvoch rezistencií.

1 - donor, 2 - recipient, 3 - FLP1^a: recipient, 4 - number of transductants^b, a - phage lysate from donor, b - number of positive transductants colonies per 1 ml of transductant mixture. Numbers represent average values from five independent experiments, * - transfer of both resistances.

[18]. Porovnaním schopnosti buniek utilizovať sacharózu po prenose do buniek recipienta, či už transdukciou P1 bakteriofágom, konjugáciou alebo využitím mini-Mu derivátov, získame bunky *E. coli* s porovnateľnou schopnosťou rastu na sacharózových médiach [19].

Ďalšou oblasťou, v ktorej nachádza uplatnenie P1 transdukčný systém, je konštrukcia kmeňa *E. coli* s markerom pre deléciu chromozómovej β -laktamázy. Tento enzým hydrolyzuje peptidickú väzbu v β -laktámovom kruhu penicilínových antibiotík. Cieľom našich experimentov je umiestniť gén tetracyklínovej rezistencie k delícii chromozómového génu pre β -laktamázu (*ampC*) pomocou P1 transdukcie. Toto by umožnilo rýchlu a jednoduchú selekciu pri prenose $\Delta ampC$ génu delécie do iných bakteriálnych kmeňov (tab. 4.).

Treba spomenúť aj niektoré obmedzenia využitia P1 transdukčného systému. Okrem už spomínanej veľkosti prenášaných fragmentov [6], je tu problém stabilnej integrácie prenášaných fragmentov do DNA recipientných buniek rekombináciou, alebo substitúciou, ktorá je najúspešnejšia u *recA* kmeňov [2] a problém abortívnej transdukcie [2,4], kedy vznikajú malé kolónie so zmenenými vlastnosťami. Z praktického hľadiska je niekedy dosť pracné získať P1 fágové lyzáty donorového kmeňa s dostatočne vysokým titrom, ktoré sú predpokladom úspešnej transdukcie a prenosu žiadaného génu. Uvedené obmedzenia v žiadnom prípade neznižujú možnosť využitia P1 transdukčného systému pri prenose významných génov *E. coli*. P1 získala ohromný praktický význam ako generalizovaný transdukčný fág a stále sa využíva v molekulárno-biologickom výskume. Pokúšame sa spájať výhody dvoch transdukčných systémov a to P1 transdukčného systému a systému využívajúceho minideriváty bakteriofága Mu pri prenose ďalších priemyselne významných génov [14].

TABULKA 4. Prenos delécie *ampC* génu označeného tetracyklínovou rezistenciou.

TABLE 4. Transfer $\Delta ampC$ gene marked with tetracycline resistance.

| Donorový kmeň ¹ | Recipientný kmeň ² | Počet pozitívnych transduktantov ^{* 3} |
|----------------------------|-------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> JT24 | <i>E. coli</i> MI1443 | 1,2.10 ⁴ |
| <i>E. coli</i> MM121 | <i>E. coli</i> MC4100 | 1,6.10 ⁴ |

* - pozitívni transduktanti nerástli na 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ampicilínu, * - počet pozitívnych transduktantov na ml transdukčnej zmesi.

1 - donor strains, 2 - acceptor strains, 3 - number of positive transductants, * - no growing positive transductants on 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ampicilin plates, * - number of positive transductants per ml transduction mixture.

Záver

Pri klonovaní rôznych génov je snahou dostať žiadaný gén z donorového organizmu do organizmu recipienta a zabezpečiť expresiu tohoto génu. Bežný postup obsahuje izoláciu DNA donora, jej štiepenie restriktívnymi endonukleázami, ligáciu vhodného fragmentu do príslušného vektora a napokon transformáciu kompetentných buniek a následnú selekciu transformantov. Tento pracovný postup je nahraditeľný práve využitím bakteriofága P1, ktorý dokáže preniesť funkčný gén alebo operón do bunky recipienta a iba vhodnou selekčnou metódou dokážeme prejav génu identifikovať v bunkách recipienta. P1 transdukcia je postačujúci klonovací postup pri príprave nových bakteriálnych kmeňov, v ktorých nám nejde o výrazné zvýšenie produkcie bielkoviny, ale len o zavedenie markera, alebo zmeny vlastností bakteriálnej bunky.

Transdukčný proces génov zabezpečujúcich prenos rezistencie voči antibiotikám je prvým stupňom pri konštrukcii nových produkčných kmeňov. V našom prípade sa prenos tetracyklínovej rezistencie využil pri selekcii transduktantov s *ampC* génom pri konštrukcii produkčného kmeňa pre nadprodukcii antibiotika penicilínu. Rovnako významné najmä z potravinárskeho hľadiska je prenos sacharázového operónu pri konštrukcii produkčných kmeňov aminokyseliny L-treonínu.

Prítomnosť bakteriofágov v biotechnologicky produkčných bunkách nemusí byť vždy žiaduca. Mnohé bakteriofágy ako súčasť prirodzeného obsahu buniek bunkám neškodí a ich prítomnosť pri fermentáciách nie je závadou. Sú však aj také fágy, ktoré svojou agresivitou sú schopné spôsobiť lýzu buniek a tým na niekoľko fermentácií vyradiť fermentačný proces. Voči týmto bakteriofágom sa vedie vo fermentačnom procese neustály zápas.

Literatúra

1. MEYER, J.: P1 bacteriophage. In: Encyclopedia of virology. Vol. 2. Ed. R. G. Webster - A. Granoff. New York, Academic press 1994, s. 997-1003.
2. STERNBERG, N. - HOESS, R.: The molecular genetics of bacteriophage P1. A. Rev. Genet., 17, 1983, s. 123-154.
3. SANDMEIER, H. - MEYER, J.: Bacteriophages. In: Biotechnology. Ed. H. J. Rehm et al. Vol. 1. Biological fundamentals. Ed. H. Sahm. 2. vyd. Weinheim, VCH 1993, s. 544-575.
4. MARGOLIN, P.: Generalized transduction. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Ed. F. C. Neidhardt et al. Washington, D. C., American Society for Microbiology 1987, s. 1154-1168.
5. STERNBERG, N. - MAURER, R.: Bacteriophage-mediated generalized transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Meth. Enzymol., 204, 1991, č. 1, s. 18-42.

6. STERNBERG, N.: Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc. nat. Acad. Sci. USA.*, 87, 1990, s. 103-107.
7. YARMOLINSKY, M. B. - STERNBERG, N.: Bacteriophage P1. In: *The bacteriophages*. Vol. 1. Ed. R. Calendar. New York, Plenum Press 1988, s. 291-438.
8. WEISBERG, R. A.: Specialized transduction. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Ed. F. C. Neidhardt et al. Washington, D.C., American society for microbiology 1987, s. 1169-1176.
9. CRAIG, N. L. - KLECKNER, N.: Transposition and site-specific recombination. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Ed. F. C. Neidhardt et al. Washington, D.C., American society for microbiology 1987, s. 1054-1070.
10. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1982, s. 68.
11. LENNOX, E. S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1, 1955, s. 190-206.
12. SMITH, H. W.: Survival of orally administered *E.coli* K12 in alimentary tract of man. *Nature*, 255, 1975, s. 500-502.
13. SAMBROOK, J. - FRITSCH, E. F. - MANIATIS, T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, s. A12.
14. STUHLÍK, S. - JANITOROVÁ, V. - TURŇA, J.: Cloning of toxic genes with mini-Mu derivative of bacteriophage Mu. *Acta virol.*, 37, 1993, s. 369-376.
15. CONDON, C. - WEINER, J. H.: Fumarate reductase of *E. coli*: An investigation of function and assembly using in vivo complementation. *Molec. Microbiol.*, 2, 1988, č. 1, s. 43-52.
16. SILHAVY, T. J. - BERMAN, M. L. - ENQUIST, L. V.: *Experiments with gene fusion*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1984, s. xi-xii.
17. SCHMID, K. - SCHUPFNER, M. - SCHNITT, R.: Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K12. *J. Bact.*, 151, 1982, s. 68-76.
18. GRONES, J. - MAČOR, M. - BILSKÁ, V.: Cloning of sucrose operon with mini-Mu and plasmid-mediated metabolism of sucrose. *Folia microbiol. (Praha)*, 41, 1996, č. 4, s. 315-319.
19. MAČOR, M. - TURŇA, J. - GRONES, J.: Cloning and transfer of sucrase operon in *Escherichia coli*. *J. microbiol. Meth.*, 26, 1996, č. 1/2, s. 119-124.

Do redakcie došlo 14.5.1997.

Using of bacteriophage P1 for in vivo cloning

MAČOR, M. - VIZVÁRYOVÁ, M. - TURŇA, J.: *Bull. potrav. Výsk.*, 36, 1997, p. 191-200

SUMMARY. Bacteriophage P1 was used for transfer of genes for tetracycline and kanamycin resistance in *Escherichia coli* cells. We wanted to show that bacteriophage P1 could be used as a powerful tool for the construction of the bacterial strains with new qualities.