

## AZ 1-ES TÍPUSÚ HUMÁN ADENOVÍRUS DNS HINDIII-FRAGMENTUMAINAK KLÓNOZÁSA pBR322/E. COLI RENDSZERBEN

PALKONYAY LÁSZLÓ, MEDVECZKY PÉTER, SZOMOLÁNYI ÉVA,  
BERENCSEI GYÖRGY és NÁSZ ISTVÁN, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1982. II. 15.

A génmanipulációs eljárások lehetővé teszik, hogy a vírus-DNS, esetleg vírus-polipeptid termelés baktérium rendszerben valósuljon meg. Ez azért előnyös, mert a szövettanyészetben történő vírustermelés drága, a vírus és a vírus DNS-hozam alacsony. A 2-es típusú adenovírus genomjának mintegy 15%-át lambda fág vektor felhasználásával már sikerült baktériumsejtbe integrálni (Tiollais és mtsai 1976, Perricaudet és mtsai 1977). A 3-as és a 7-es típusú vírus klónozása során pedig — amelyek egy másik adenovírus subgenusba tartoznak — a vírus genom 87%-át sikerült a pBR322 plazmid vektor segítségével baktériumokba juttatni (Engler és Kilpatrick 1981).

Célszerűnek látszott ezért genetikai manipulációs technikával az 1-es típusú adenovírus DNS HindIII fragmentumait (Medveczky és mtsai 1981) baktériumba juttatni. A HindIII enzim hatására „ragadós végű” DNS töredékek keletkeznek (Roberts 1976), amely kohézív végződéseket DNS ligáz kovalensen összekapcsolhat. A vektorként alkalmazott pBR322 jelű, gyűrű alakú plazmidon a HindIII egy támadásponttal rendelkezik. Hatására a gyűrű linearizálódik, a DNS lánc két végén komplementer kohézív („ragadós”) végzések kialakulásával. Ha a vírus DNS HindIII fragmentumait DNS ligáz jelenlétében HindIII-mal linearizált pBR322-vel elegyítjük, kovalens kötések alakulnak ki. Ez végső soron különböző vírus-plazmid rekombinánsok keletkezéséhez is vezet, hiszen a ligáz hatására létrejövő pBR322 recirkularizáció az esetek egy részében vírus DNS töredékek beépülésével következik be. Így lehetőség nyílik a vírus-plazmid rekombinánsok baktériumokba juttatására, transzfeckciójára.

### *Anyagok és módszerek*

#### *Vírustermesztés és DNS izolálás*

Az 1-es típusú emberi adenovírus prototípus törzset HEp-2 szuszpenziós sejtkultúrában szaporítottuk. A vírus tisztítást és a DNS izolálást a korábban ismertetett módon végeztük (Medveczky és mtsai 1976, Berencsei és mtsai 1978, Zavizion és mtsai 1978).

### *Alkalmazott enzimek*

A már többször említett HindIII (Haemophilus influenzae R<sub>d</sub>) enzimen kívül, a rekombináns plazmidok vírus eredetű DNS elemeinek azonosítására (1. később), a következő bakteriális restriktációs endonukleázokat használtuk: SmaI (Serratia marcescens S<sub>b</sub>), BamHI (Bacillus amyloliquefaciens H), KpnI (Klebsiella pneumoniae) és EcoRI (Escherichia coli RY-13) (Roberts 1976, Berencsi és mtsai 1978, Medveczky és mtsai 1981).

A vírus-plazmid rekombinánsok *in vitro* kialakítása T<sub>4</sub> polinukleotid ligáz felhasználásával történt (Szomolányi és mtsai 1980).

### *A rekombináns DNS kialakítása és klónozása*

A vírus és pBR322 DNS-t emésztettük HindIII enzimmal, majd T<sub>4</sub> ligázzal *in vitro* alakítottuk ki a vírus-plazmid rekombináns DNS-eket, 24 órás inkubálással 12 °C-on. A vírus-DNS-t csak részlegesen emésztettük a HindIII endonukleázzal, hogy a ligálás során minél tágabb határok között változzék a DNS-töredékek molekulásúlya. A sikeres klónozáshoz vezető kísérleteknél a ligáláskor a vírus DNS-koncentráció 2,5 µg/ml, a plazmidé 56,2 µg/ml volt (1 : 22,5). A pBR322-t tartalmazó baktérium törzset E.M. Lederbergtől (Stanford Univ. Kalifornia, USA) kaptuk. A rekombináns plazmidokat CaCl<sub>2</sub>-os módszerrel juttattuk be a recipiens baktériumokba (Cohen és mtsai 1972). A CaCl<sub>2</sub>-os transzfekeciókat különböző DNS mennyiséggel végeztük. Sikeres volt a transzfekeció a 292, 146, 73, 36,5, 18,2 µg/ml DNS-(vírus + pBR322) koncentráció esetén.

A pBR322 plazmid ampicillin és tetracyclin rezisztencia gént hordoz (Bolivar és mtsai 1977). A HindIII enzim a gyűrűt a tetrán gén prometerébe vágva nyitja fel (Stüber és Bujard 1981). Mivel a vírus DNS-fragmentumok a ligálás során ide ékelődnek be, lehetőség nyílik a vírus DNS-elemeket hordozó baktérium törzsek (klónok) szelektálására klasszikus mikrobiológiai módszerrel. Recipiensként E. coli HB 101 törzset alkalmaztunk, amelyik ampicillin és tetracyclin érzékeny (Szomolányi és mtsai 1980). Azok a baktériumok, amelyekbe a transzfekeció során rekombináns plazmid került ampicillinre rezisztenssé váltak, de mivel a tetrán gén prometerébe beékelődött az idegen DNS, e gén expressziója zavart szenved, így tetránra érzékenyek maradnak. Rekombináns plazmidot tartalmazó klónok szelektálását 100 µg/ml ampicillin és 20 µg/ml tetrán tartalmú szilárd élesztő-trypton táptalajon (YTB) végeztük. Az indifferens, plazmid nélküli baktériumok egyik táptalajon sem szaporodtak. A ligálás során rekombináns nélkül gyűrűvé záródó plazmidokban a kettéhasadt tetrán prometer újra egyesül. Az ilyen plazmidot tartalmazó baktériumok nemcsak ampicillines, de tetrános táptalajon is képesek szaporodni. A szelektált ampicillin rezisztens, tetrán érzékeny klónok plazmidjaiban számíthatunk integrálódott vírus DNS-fragmentumok jelenlétére.

Az egyes baktérium törzsekbe integrálódott vírus DNS-darabok azonosításához viszonylag nagy mennyiségű rekombináns plazmidra volt szükség. Az egyes baktériumokban levő plazmidok mennyiségének növelésére folyékony YTB táptalajon chloramphenicolos (170  $\mu\text{g/ml}$ ) amplifikációt alkalmaztunk (Clewell 1972). A chloramphenicol megakadályozta a baktériumok további szaporodását, miközben a plazmid replikáció zavartalan maradt.

#### *A DNS fragmentumok szétválasztása*

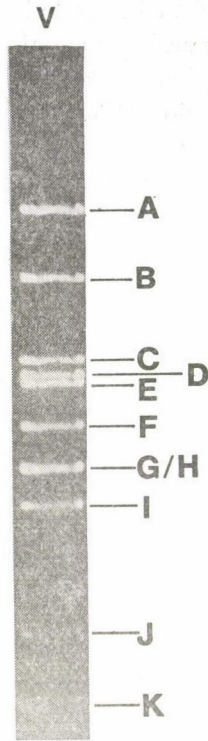
Kísérleteink különböző fázisaiban a DNS kimutatását agaróz gél elektroforézissel végeztük, 0,04 M Tris-HCl, 0,005 M Na-acetat puffer rendszerben (Helling és mtsai 1974). 1%-os Sea Chem HGTP agaróz horizontális lapgél használunk. Valamennyi futtatás szobahőmérsékleten történt 2–4 V/cm feszültségesséssel. A géleket 1  $\mu\text{g/ml}$  ethidiumbromiddal festettük (15 min), majd ORWO-DK-5-ös filmre fényképeztünk, UV megvilágítással. Narancssárga előtétiszűrőt és UV-zárófiltert alkalmaztunk.

#### *Blot-hibridizáció*

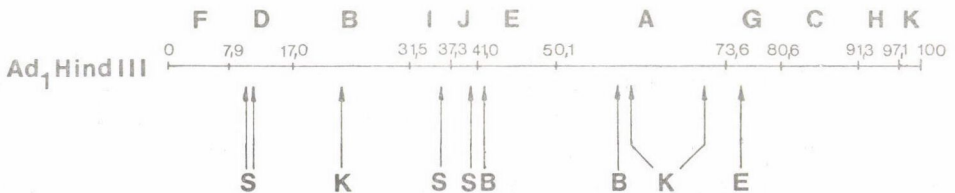
A rekombináns DNS-molekulákban blot-hibridizációval igazoltuk, hogy valóban az 1-es típusú adenovírus nukleotid sorrendjei épültek be a plazmidba. Az agaróz lapgélben a restriktív enzimmel feldarabolt rekombinánsok DNS-töredékeit elektroforézissel szétválasztottuk, majd *Alwine* és mtsai (1977) módszere szerint szűrőpapírra itatva a DNS-csíkokat rögzítettük. A szűrőpapírt *in vitro*  $^{32}\text{PO}_4$ -tal jelzett adenovírus DNS-sel hibridizáltuk. Azok a DNS-töredékek, amelyek az adenovírus-DNS-ből származó nukleotid-sorrendeket is tartalmaztak, autoradiográfiás X-omat (Kodak) filmen a kötődött izotóp hatására fekete foltok formájában láthatóvá váltak.

#### *Eredmények*

A HindIII restriktív endonukleáz az 5'-A/AGCTT-3' nukleotid szekvenciát vágja át (Old és mtsai 1975). Ez a szekvencia az 1-es típusú adenovírus DNS-ben tizenkétszer fordul elő, így az tizenhárom töredékre hasad (Medveczky és mtsai 1981). A fragmentumok jelölése konvenció szerint az ABC nagy betűvel történik, az agaróz elektroforézis alapján. A legnagyobb molekulásúlyú DNS-darab betűjele az A, a másodiké a B és így tovább (1. ábra). A kísérletekhez felhasznált vírusnukleinsavat csak részlegesen hasítottuk a HindIII enzimmel. Az 1. ábrán bemutatott DNS-töredékeken kívül ezért 2–3 darabból álló hosszabb egységek is jelen voltak (pl. B + I vagy G + C + H). Ennek az volt a célja, hogy minél változatosabb összetételű rekombináns populációt sikerüljön kialakítani.



1. ábra. 1-es típusú adenovírus DNS HindIII fragmentumainak elektroforetikus képe. A 13 fragmentumból 10 látszik, mert a G és H fragmentum molekulásúlya egyforma, így a gélben egy csíkot alkotnak, az L és M töredékek pedig olyan kis molekulatömeggel rendelkeznek, hogy kifutottak a gélből az elektroforézis során. A mintát a gél V betűvel jelzett pontján vittük fel. A vándorlási távolság növekedésével a DNS-darabok molekulatömege arányosan kisebb. A töredékeket az ABC betűi nagyság szerint jelölük



2. ábra. 1-es típusú adenovírus DNS HindIII térképe ( $Ad_1$  HindIII). Az  $Ad_1$  DNS-t jelképező vonal fölötti betűk mutatják meg a fragmentumok tényleges helyzetét a genomban. A számok a HindIII enzim 10 támadáspontjának lokalizációját jelölik a gén-térképen, a 0 és 100 kivételével, melyek a lineáris vírus DNS bal és jobb végét jelentik. Az L fragmentum a G és C töredékek, az M fragmentum a B és I darabok között helyezkedik el. (Kis méretük miatt nincsenek jelölve.) A vonal alatti betűk és nyilak egyéb, a keresztmetsztéses fragmentum azonosításánál használt endonukleázok metszéspontjait jelképezik: S = SmaI; K = KpnI; B = BamHI és E = EcoRI. Ezeknek a restrikciós enzimeknek több támadáspontja is van, mint amit feltűntettünk. A nyilak csak azokat a hasítási helyeket mutatják, amelyeket felhasználtunk a rekombinációs plazmidok beékelődött vírus DNS-darabjainak azonosításához

HindIII enzim emésztés segítségével, elméletileg a vírus DNS túlnyomó részének (89,2%) klónozása lehetséges, mivel a két szélső töredéket, a HindIII-F és -K fragmentumot, nem lehet a pBR322 gyűrűbe integrálni. E töredékeknek ugyanis csak az egyik végét alakította ki az enzim, a másik végükön így nem rendelkeznek kohézív nukleotid szekvenciával, ami a ligálás előfeltétele (2. ábra). Nem klónozható hasonló okból a részleges HindIII emésztés következtében épen maradó F + D vagy H + K fragmentum sem.

Klónozási kísérleteinkben a 292, 146, 73 és 36,5  $\mu\text{g/ml}$  DNS-sel végzett transzfekció után egyaránt lehetett ampicillin rezisztens, tetracyclin érzékeny klónokat izolálni.

### *A vírus DNS-t hordozó plazmid rekombinánsok azonosítása*

#### *a) HindIII újra emésztés*

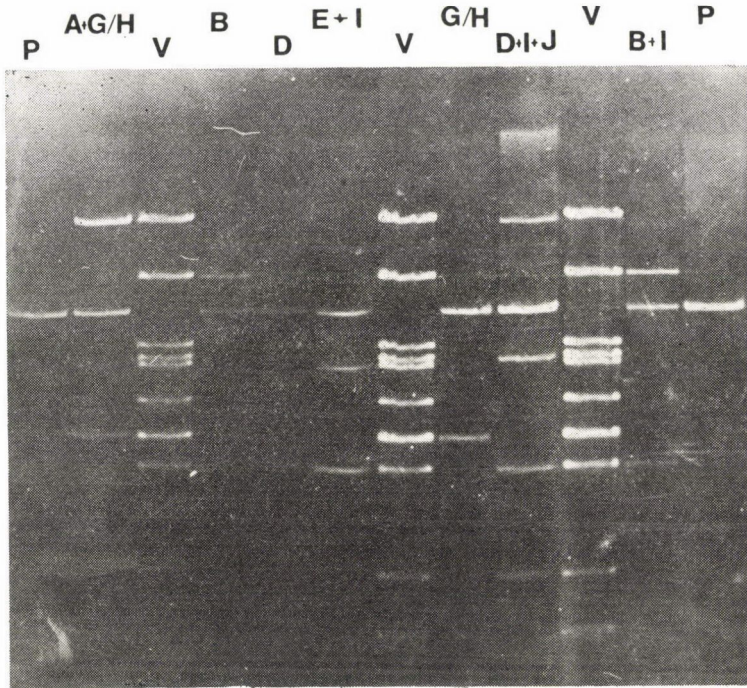
Az izolált plazmid DNS-t ismételt HindIII emésztésnek vetettük alá és agaróz gél elektroforézist végeztünk. Kontrollként HindIII-mal emésztett pBR322-t és virion DNS-t használtunk. Az emésztés eredményeként a pBR322 DNS újra lineáris lesz, a beékelődött fragmentum is lehasad a vektorról. Ha egy plazmidba több vírus DNS-darab integrálódott, teljes emésztés esetén ezek is különválnak, hiszen valamennyi fragmentum a HindIII által kialakított „ragadós vége” révén tudott a pBR322-be beépülni.

A 3. ábrán valamennyi vírus DNS fragmentum szerepel, amelyiknek sikerült a klónozása. Az alkalmazott metodikából következik, hogy a HindIII-F és -K nem képes a pBR322-be beépülni. A rendkívül kicsiny mérete miatt nehezen kimutatható HindIII-L és M fragmentumon kívül elvileg 9 vírus DNS töredék klónozható, melyek közül 8 azonosítható a fényképen vándorlási sebessége alapján.

A HindIII-A,-B,-D,-E,-I és -J töredék egyszerűen identifikálható a virion kontroll azonos helyzetű csíkjai révén. A G és H fragmentum is azonosítható, de egymástól e módszerrel nem különíthető el, mert az azonos molekulásúly miatt az elektroforézis képen a két csík egybeesik. Ezért az ábrán az ilyen helyzetű inszerteket G/H-val jelöltük.

A HindIII újraemésztéssel összesen 32 vírus eredetű inszertet azonosítottunk. A legtöbb baktérium, amelybe rekombináns plazmid integrálódott, egyetlen beékelődött vírus DNS-töredéket tartalmazott. Néhány esetben azonban egy baktérium klónban két, sőt egy alkalommal három vírus eredetű fragmentum is kimutatható volt, hiszen a HindIII vírus fragmentumok és a vektor ligálásakor a minél többféle rekombináns keletkezésének céljából, HindIII-mal részlegesen emésztett virion DNS-t alkalmaztunk a reakcióelegyen.

A 3. ábrán a HindIII-D és -E fragmentum jól elkülöníthető egymástól és a hozzájuk igen hasonló molekulásúlyú C fragmentumtól. Sok esetben a ha-



3. ábra. Néhány klón rekombináns plazmidjának elektroforézise HindIII újraemésztés után. P = pBR322 kontroll, V = virion DNS kontroll. Minden mintában egyedi klónokból izolált rekombináns DNS futott. A rekombinánsokat a bennük azonosított Ad<sub>1</sub>-HindIII darabok jelzései (A, B, D, E, G/H, I és J) jelöltük. A B + I, valamint az A + G/H jelzésű klónokban szomszédos adenovírus HindIII töredékek épültek be egyetlen pBR322 vektorba. A D + I + J jelzésű klónban pedig egyidejűleg két rekombináns található. Az egyikben csak az Ad<sub>1</sub>-HindIII-D, a másikban a HindIII-I + J töredék van jelen. (Részleteket lásd az 1. táblázatban)

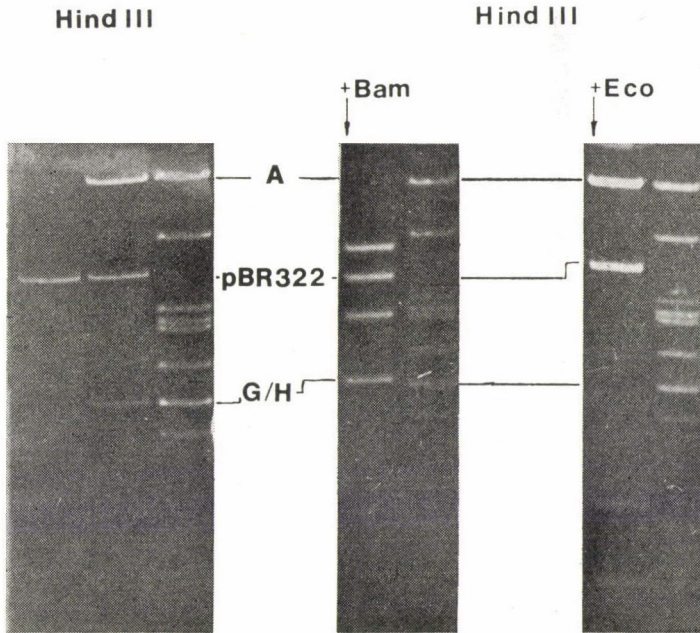
sonló vándorlási sebesség miatt e három csík határa a gél fényképén elmosódik, nehezítve vagy lehetetlenné téve az azonosítást. Az ábrán látható fragmentumok pontos azonosítására és a HindIII-G és -H elkülönítésére egyéb restriktív enzimeket is alkalmaztunk, amelyeknek a hasítási helyeit a 2. ábrán feltüntettük.

#### b) Keresztemésztés vagy második emésztés

Ismert támadáspontú restriktív endonukleázzal pontosan identifikálható a plazmidba épült vírus DNS-fragmentum. Ha a HindIII újraemésztés után az inszertet olyan enzimmel inkubáljuk, amelyik azt hasítja, akkor az újabb elektroforézis során a gél fényképén eltűnik az inszert csíkja és az enzim hasítási helyeitől függően két vagy több, alacsonyabb molekulásúlyt reprezentáló

helyzetű csík jelenik meg. A kísérletekben használt enzimeket, támadáspontjukat a 2. ábra mutatja.

A HindIII hidrolízis után a többi restrikciós endonukleázzal elvégzett keresztmésztés nemcsak az A, B, D, E, I és J fragmentumok pontosabb azonosítási módszerének bizonyult, hanem lehetővé tette a G és H inszertet tartalmazó klónok differenciálását is. Ezt illusztrálja a 4. ábra, amely egy keresztmésztés után elvégzett elektroforézis gél fényképe. A vizsgált klónba a plazmid vektor útján a HindIII újraemésztés szerint az A és a G/H fragmentum került. A keresztmésztés igazolta az újraemésztéses vizsgálat eredményét, hiszen a BamHI enzim a HindIII-A fragmentumot kettéhasította, a G/H jelűt nem támadta meg. Ez megfelel a 2. ábrán bemutatott támadáspontnak. A 2. ábráról az is leolvasható, hogy az EcoRI enzimnek a G szakaszon van támadáspontja (az A-n és a H-n nincs). Ennek megfelelően az elektroforézis utáni felvételen az A fragmentum intakt, a G/H jelű pedig két kisebbre hasad, bizonyítva ezzel, hogy a klón az A fragmentumon kívül a G-t tartalmazza, nem a H-t (4. ábra).



4. ábra. HindIII-A és G fragmentum azonosítása BamHI és EcoRI keresztmésztéssel egyetlen rekombinánsban. a) A plazmid és virion kontroll között a HindIII újraemésztés után Ad<sub>1</sub>-HindIII-A és- G/H nak megfelelő csíkok láthatók. Középen és jobb oldalon a virion kontroll mellett, a BamHI és az EcoRI hasítási helyének megfelelően a keresztmésztés után a kettéhasadt A és G fragmentum helyett két-két alacsonyabb molekulású DNS darabot reprezentáló csíkot látunk. b) BamHI emésztés hatására a HindIII-A darab két kisebb töredékre esik szét, amelyek nagysága alapján a 2. ábrán bemutatott (B) metszéspontra azonosítható. c) EcoRI emésztés hatására a kisebbik, HindIII-G/H töredék két kisebb darabra esik szét, ami a 2. ábra (E) jelzése alapján bizonyítja, hogy a rekombinánsba a HindIII-G fragmentum épült be

1. táblázat

A pBR322 plazmid HindIII pontjára beépített adenovírus DNS töredékek száma és molekulásúlya\*

Az adenovírus DNS darab molekulásúlya (Md)	HindIII-specifikus DNS-szakasz megjelölése	A DNS-töredéket tartalmazó klónok száma	Azoknak a DNS-töredékeknek a száma, amelyek vizsgálata megtörtént:	
			**Keresztmésztéssel	***Blot-hibridizációval
6,81	A + G	1	2	1
4,73	B + I	1	—	—
3,5	B	6	1	1
3,33	E + I	1	—	1
2,18	D	10	2	2
2,11	E	4	—	1
1,95	I + J	1	1	1
	G	1	1	1
1,43	G vagy H	2	—	—
	H	1	1	1

\* Egyetlen, részlegesen HindIII enzimmel hasított adenovírus DNS/pBR322 DNS rekombináns keverék segítségével kialakított klónok összetétele. A klónok válogatását és azonosítását az ampicillin rezisztencia és a tetracyclin érzékenység alapján addig folytattuk, amíg valamennyi 0,5 Md-nál nagyobb molekulatömegű adenovírus töredéknek legalább egyetlen példányát sikerült azonosítani, így a klónszelektió a rekombinánsok minőségi összetétele szempontjából véletlenszerűnek tekinthető.

\*\* A töredékek azonosítását HindIII enzimen kívül BamHI, KpnI, EcoRI vagy SmaI restrikciós endonukleáz segítségével is elvégeztük.

\*\*\* Blot-hibridizáció segítségével igazoltuk, hogy a rekombinánsba valóban 1-es típusú adenovírus DNS épült be.

Számos klón keresztmésztéses vizsgálatát elvégeztük, s minden esetben igazolódtott a HindIII újraemésztéses fragmentum azonosítás helyessége (1. táblázat).

### c) Blot-hibridizáció

Blot DNS hibridizációs kísérlettel is azonosítottuk a klónokat. HindIII újraemésztés után elektroforézissel szeparáltuk a rekombináns plazmidok töredékeit, majd denaturálást követően *Alwine* és *mtsai* (1977) szerint szűrőpapirosra kötöttük. <sup>32</sup>P-jelzett 1-es típusú adenovírus DNS készítménnyel hibridizáltunk. A papiros fölé helyezett röntgen filmen a pBR322-nek megfelelő csíkok helyén nem volt feketedés, de az inszerteket tartalmazó csíkok láthatóvá váltak a filmen, mert az adenovírus specifikus nukleotid sorrendekhez kötődött a <sup>32</sup>P-DNS.



*A különböző fragmentumok beépülésének gyakorisága*

A HindIII újraemésztés, a keresztemésztés és a DNS hibridizáció alapján megállapítható, hogy az 1-es típusú adenovírus genetikai állományának  $78,5 \pm 0,3\%$ -át sikerült *E. coli*-ba juttatnunk. A baktériumokban az egyes DNS-fragmentumok a rekombináns pBR322 részeként replikálódtak. Az 1. táblázat mutatja, hogy a különböző fragmentumok előfordulása az ampicillin rezisztens, tetrán érzékeny baktériumokban nem egyforma, sőt HindIII-C fragmentumot egyetlen klónban sem találtunk. A klónok azonosítását addig folytattuk, ameddig mind a legnagyobb, mind a legkisebb DNS-töredéket is sikerült a rekombinánsokban azonosítani. Összesen 32 HindIII töredék azonosítása során elértük ezt a célt. Az 1. táblázat adatai azonban azt mutatják, hogy a 32 vírus-DNS-fragmentumot 27 klónban találtuk meg. 4 rekombináns kettős HindIII darabokat tartalmazott. Az A + G, B + I, valamint az I + J szomszédos töredékek az 1-es típusú adenovírus DNS-ben (2. ábra), ezek tehát részlegesen emésztett DNS-molekulákból kerülhettek a rekombinánsokba a ligálás során. Az E + I darabok egymástól távolabb elhelyezkedő töredékek a vírusgenomban, így ezek a ligálás során különálló darabokból, mozaikszerűen épültek össze. A 27 klón egyike két különböző rekombinánsot tartalmazott, egyikük az I + J, másikuk a D vírus-töredéket tartalmazta (3. ábra). Annak ellenére, hogy a klónokban az I és J fragmentumokat is megtaláltuk, az 1. táblázat adatai mutatják, hogy klónozni csak 1,43 Md-nál nagyobb, és 6,81 Md-nál kisebb DNS-szakaszokat sikerült. A két legkisebb fragmentum (L és M) egyedüli megjelenése egy rekombinánsban alacsony molekulásúlyuk miatt még kevésbé várható, hiszen nagyságrendjük a többi HindIII fragmentumok molekulásúly meghatározásánál kapott szórásoknak megfelelő. Az L és M töredék együttesen a vírus genomhosszának csupán 0,3%-át alkotja. Mivel részlegesen emésztett vírus DNS-sel dolgoztunk, elképzelhető, hogy a két legkisebb fragmentum is bekerült valamelyik rekombináns plazmidba. (Pl. az M a B + I, az L pedig a G jelzésű klónba.)

Szoros összefüggés mutatható ki a DNS-szakaszok nagysága, valamint a rekombinánsokban történő előfordulásuk gyakorisága között. 28 rekombinánsból 10-ben a D-töredék (2,18 Md) 7-ben pedig B, és E + I (3,5 és 3,33 Md) fordult elő, azaz a rekombinánsok csaknem kétharmad részében olyan vírus-DNS-szakaszok vannak, amelyek nagysága megközelíti a vektor pBR322 DNS méretét (2,7 Md). Szembetűnő azonban, hogy az egyetlen (HindIII-C) vírus-DNS-töredék nagysága, amelyet egyetlen rekombinánsban sem sikerült azonosítani 2,3 Md, tehát legjobban megközelíti az optimális 2,7 Md nagyságot. A HindIII-C töredéket tehát több mint 10 klónnak kellene tartalmaznia, amelyek ampicillin rezisztensek, de tetracyclin érzékenyek.

### Megbeszélés

A HindIII restriktációs endonukleáz segítségével sikerült az 1-es típusú humán adenovírus DNS 0,785 ( $\pm$  0,003) genomhosszúságnak megfelelő szakaszát klónozni. Ampicillin jelenlétében a rekombináns plazmidok nemzedékeken keresztül stabilnak bizonyultak. A baktériumsejtekben folyamatosan replikálódtak az adenovírus DNS szakaszai is.

Az inszertek nagyságát és a rekombinánsok keletkezésének gyakoriságát figyelembe véve azt a következtetést lehet levonni, hogy azok a vírus-DNS-töredékek klónozzhatók legjobban az alkalmazott kísérleti körülmények között, amelyeknek mérete leginkább megközelíti a vektorként alkalmazott pBR322 plazmid nagyságát. Kisebb gyakorisággal azonban kétszer rövidebb (1,43 Md), valamint kétszer hosszabb (6,81 Md) inszerteket tartalmazó klónok is izolálhatók.

A HindIII-C töredéket, annak ellenére, hogy a DNS-fragmentum nagysága legjobban megközelíti a plazmid DNS hosszúságát, nem találtuk meg egyetlen ampicillin rezisztens, de tetracyclin érzékeny klónban sem.

Grisin és mtsai (1981) a 6-os típusú humán adenovírus klónozása során ugyancsak megfigyelték, hogy HindIII-C töredék nem ad tetracyclin érzékeny klónokat pBR322 vektor alkalmazásakor. Szóbeli közlés alapján tudjuk, hogy a tetracyclin rezisztenciát megtartott klónok között találtak olyanokat, amelyekbe HindIII-C inszertet tartalmazó rekombináns épült be.

Stüber és Bujard (1981) fág-DNS-vizsgálatok kapcsán már korábban megfigyelte, hogy a pBR322 plazmid tetracyclin génjének a működését fág-promoterek lehetővé tudják tenni.

A kísérletek során megfigyelt jelenségnek azért van biológiai jelentősége, mert egy emlősvírus DNS-ében sikerült egy DNS szakaszt kimutatni, amelyik a rekombinánsban az integrált DNS által megszakított, P<sub>2</sub> jelzésű pBR322-promotert ki tudja egészíteni. Grisin és mtsai (1981) eredménye azért fontos, mert igazolja, hogy ez a képesség az adenovírusok azonos subgenushoz tartozó, de eltérő típusba sorolt vírus genomjában is kimutatható.

Annak a kérdésnek az eldöntése, hogy az adenovírus promoterek közül az egyik képes a bakteriális rendszerben önállóan megindítani a transzkripciót vagy pedig a vírus-DNS HindIII-C töredéke csak kiegészíti a hibás pBR322-promotert, még kísérleti stádiumban van.

Az eredmények alapján azt a következtetést már a jelenlegi stádiumban is le lehet vonni, hogy a megfigyelt különbség oka a HindIII-C vírus-DNS-fragmentum jobb oldalán található. Rendelkezünk ugyanis egy olyan rekombinánsal, amelyikben a pBR322 plazmid az 1-es típusú humán adenovírus EcoRI-C töredékét hordozza. A pBR322 DNS-en az EcoRI endonukleáz azonos promotert inaktívál, mint a HindIII. Az EcoRI-C fragmentumban az 1-es típusú adenovírus DNS HindIII-C darabjának (összevethető a 2. ábra segít-

ségével) csaknem a fele benne van, az EcoRI-C klónok mégis tetracyclin érzékenyek. A HindIII-C klónok tetracyclin rezisztenciájáért, tehát az adenovírus genom 0,840—0,913 hosszúságegységek közötti rövid szakasza lehet a felelős. A 0,840—0,913 egység közötti szakasz a vírus DNS HindIII térképén a C fragmentum jobb oldalának felel meg (2. ábra).

### Összefoglalás

Kísérleteink során 1-es típusú humán adenovírus DNS HindIII fragmentumait klónoztuk pBR322/E. coli HB101 rendszerben. A vírus DNS-t hordozó rekombináns plazmidok azonosítását HindIII újraemésztéses, keresztemésztéses és DNS hibridizációs vizsgálatokkal végeztük el. 32 vírus DNS-szakaszt azonosítottunk a recipiens baktérium törzsekben.

Elméletileg az alkalmazott módszerekkel kimutathatóan 9 fragmentum klónoozható. Ebből a 9 fragmentumból 8-at sikerült megtalálni a rekombináns plazmidokban, ami a vírus genom 78,5%-át ( $\pm 0,3\%$ ) jelenti. Az egyes fragmentumok rekombinálódásának gyakorisága a választott kísérleti körülmények között összefüggött a molekulasúlyal. Azok a fragmentumok rekombinálódtak a leggyakrabban, amelyek molekulasúlya a legközelebb esett a pBR322 2,7 Md molekulasúlyához, kivételt képezett a HindIII-C fragmentum, amely annak ellenére, hogy leginkább megközelíti a vektor nagyságát egyetlen klónban sem volt kimutatható.

A genetikai manipuláció eredményeként a baktériumokba juttatott vírus-DNS-tartalmú plazmidok a recipiensben nemzedékeken keresztül stabilak voltak és nagy mennyiségben lehetett a baktériumokkal vírus-DNS-fragmentumokat termeltetni.

A klónozás során sikerült kimutatni, hogy az 1-es típusú adenovírus-DNS egyik darabja képes befolyásolni a bakteriális gazda-vektor rendszer biológiai viselkedését.

### IRODALOM

- Alwine, J. C., Kemp, D. J. és Stark, G. R.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **74**, 5350 (1977).  
 Berencsi, Gy., Medveczky, P., Naroditsky, B. S., Chaplygina, N. M., Zavizion, B. A., Tyihonyenko, T. I. és Nász, I.: Acta microbiol. Acad. Sci. Hung., **25**, 97 (1978).  
 Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L., Boyer, H. W., Cross, J. H. és Falkow, S.: Gene, **2**, 95 (1977).  
 Clewell, D. B.: J. Bacteriol., **110**, 667 (1972).  
 Cohen, S. N. Chang, A. C. Y. és Hsu, L.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA **69**, 2110 (1972).  
 Engler, J. és Kilpatrick, J.: Gene, **13**, 125 (1981).  
 Helling, R. B., Goodman, H. M. és Boyer, H. W.: J. Virol., **14**, 1235 (1974).  
 Medveczky, P., Csuzi, S., Nász, I., Ádám, É., Berencsi, Gy. és Antoni, F.: Arch. Virol., **52**, 315 (1976).

- Medveczky, P., Zavizion, B. A., Berencsi, Gy., Chaplygina, N. M., Szomolányi, É., Narogyitsky, B., S., Nász, I. és Tyihonyenko, T. I.*: Arch. Virol., **67**, 85 (1981).
- Old, R., Murray, K. és Roizes, G.*: J. molec. Biol., **92**, 331 (1975).
- Perricaudet, M., Fritsch, A., Petterson, U. és Philipson, L.*: Science **196**, 203 (1977).
- Roberts, R. J.*: CRC Rev. Biochem., 123 (1976).
- Stüber, D. és Bujard, H.*: Proc. Natl. Acad. Sci., USA **78**, 167 (1981).
- Szomolányi, É., Kiss, A. és Venetianer, P.*: Gene, **10**, 219 (1980).
- Tiollais, P., Perricaudet, M., Petterson, U. és Philipson, L.*: Gene, **1**, 49 (1976).
- Zavizion, B. A., Csaplygina, N. M., Tyihonyenko, T. I., Narogyickij, B. S., Berencsi, Gy., Medveczky, P. és Nász, I.*: Vopr. viruszol., 650 (1978).