

П. Я. БОЙКОВ, Л. Л. ГУМАНОВ

**СТРУКТУРА РЕПЛИЦИРУЮЩЕЙСЯ ДНК БАКТЕРИОФАГОВ
T4Br⁺ И T4Br1272 В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI K12(λ)**

(Представлено академиком А. А. Басвым 19 X 1972)

Мутанты фага T4 по генам r11 не способны к задержке лизиса в клетках *E. coli* B и не размножаются в лизогенных клетках. Синтез фаговой ДНК в клетках *E. coli* K12(λ) идет приблизительно до образования 20 фаговых геномов, а затем прекращается. В это время синтезируются «ранние» фаговые мРНК и белки (¹), но не происходит переключения на синтез «поздних» мРНК и белков. Решающее значение в переключении синтезов с «ранних» на «поздние» у фага T4 имеет начало синтеза ДНК (²). Для этого необходима репликация хотя бы одной молекулы ДНК. Однако, в *E. coli* K12(λ) синтез фаговой ДНК у r11-мутантов идет, но переключение на синтез «поздних» белков не происходит. Это позволяет предполагать, что гены r11 выполняют какие-то регуляторные функции. Необходимо отметить важную роль в этом явлении умеренного фага λ, или вернее его белка-репрессора (^{3, 4}).

Недавно появились данные о возможной связи функций r11 с синтезом фаговой ДНК. Так мутанты фага T4 по гену 30, кодирующему синтез ДНК-лигазы, супрессируются мутацией в генах r11 (⁵).

Целью настоящей работы являлось выяснением различий в структуре реплицирующейся ДНК фагов T4Br⁺ и T4r1272 (деления генов r11) в ранний период инфекции клеток *E. coli* K12(λ).

Фаги с меченой (C¹⁴) ДНК получали следующим образом: клетки *E. coli* BV выращивали в среде М-9 со всеми необходимыми мечеными дезоксинуклеозидами (10 мкг/мл), заражали фагом и снова добавляли меченые дезоксинуклеозиды. Такое предварительное мечение клеточной ДНК до заражения увеличивает включение радиоактивных оснований в фаговую ДНК, поскольку продукты разрушения хозяйской ДНК используются в синтезе фаговой ДНК. Дополнительная инфекция клеток в этой системе увеличивает выход фагов на клетку. Фаги очищали с помощью полиэтиленгликоля, обрабатывали ДНКазой и выделяли очищенный препарат фага ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы.

E. coli K12(λ) выращивали в среде М-9 при 37° до 2×10^8 кл/мл, собирали центрифугированием, ресуспендировали в небольшом объеме среды при 4° и заражали фагом в присутствии *L*-триптофана (50 мкг/мл). Через 3 мин. инкубации добавляли холодный раствор сахарозы в среде М-9 до конечной концентрации 5% и клетки осаждали центрифугированием на холоду при 10 000 *g* 5 мин. Таким образом отделяли неадсорбировавшиеся на клетках фаги. Осадок ресуспендировали в небольшом объеме среды (4°) и выливали в сосуд с интенсивно аэрируемой средой М-9 (37°). Этот момент принимался за нулевое время. Конечная концентрация клеток в миллилитре равнялась 3×10^8 . Посевом клеток до и после заражения на твердой питательной среде и фагов методом двойного слоя до и после адсорбции на клетках определяли эффективность и множественность заражения клеток.

В разное время после заражения отбирали пробы по 20 мл, добавляли 2,4-динитрофенол (3×10^{-3} М) или NaCN до 0,1 М и быстро охлаждали в

емеси ацетона с сухим льдом. Клетки собирали и отмывали центрифугированием на холоду буфером Л (0,05 М трис-НСl, 0,05 М NaCl, 0,015 М ЭДТА, рН 8,0) с 0,01 М NaCN. В этой же смеси клетки разрушали лизоцимом (200 мкг/мл) 30 мин. в ледяной бане, затем 5 мин. при 30°. Смесь снова переносили в ледяную баню, добавляли 4 М NaCl в буфере Л до конечной концентрации 0,5 М и 4% неионный детергент твин-80 до 0,5%. В некоторых случаях для быстрой и полной инактивации ДНКаз отмываемые клетки ресуспендировали в небольшом объеме буфера Л, помещали их в водяную баню при 70° и быстро доводили объем суспензии до 5 мл,

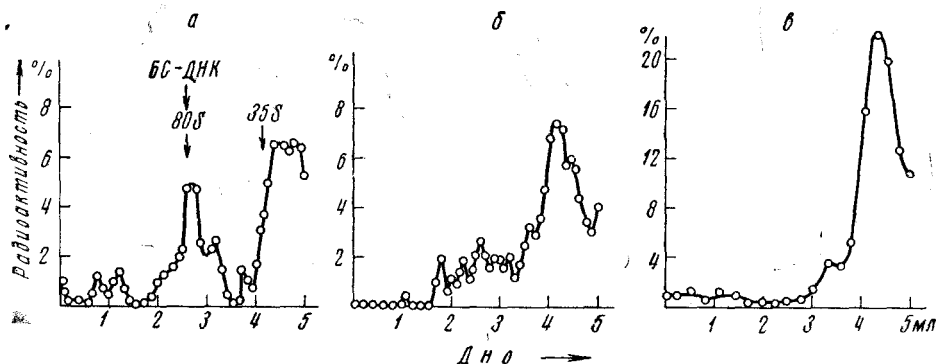


Рис. 1. Распределение C^{14} -ДНК, связанной с мембранами клеток в щелочном градиенте сахарозы. а — $T4g^+$, 5 мин. инфекции, б — $T4g^+$, 8 мин. инфекции, в — $T4g1272$, 5 мин. инфекции

приливая нагретый до 70° буфер Л. Клетки выдерживали при 70° 15 мин., охлаждали в ледяной бане и разрушали с помощью лизоцима, как описано выше. Для разделения связанной с мембранными структурами ДНК от несвязанной (свободной) $T4$ -ДНК лизаты наслаивали на поверхность 10–30% градиента сахарозы в буфере Л (30 мл) и центрифугировали

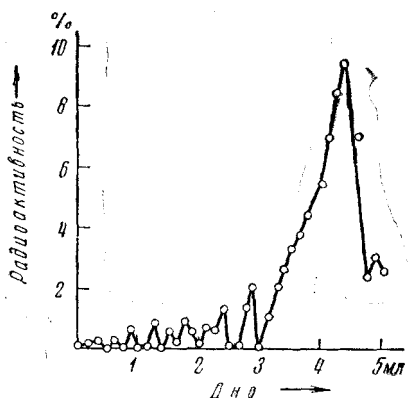


Рис. 2. Определение плотности связанной с мембранами $T4$ -ДНК в градиенте плотности $CsCl$ с этидиумбромидом. ДНК и $CsCl$ с 200 мкг/мл этидиумбромидом в 0,02 М трис-НСl-буфере, (рН 8,1) с 0,003 М ЭДТА. 0,2 мл ДНК наслаивали на преформированный градиент и центрифугировали 4 часа при 25° и 128 000 g

при 30 000 g 120 мин. При этом $T4$ -ДНК, связанная с мембранными структурами, вместе с последними осаждается на дно пробирки. Свободная $T4$ -ДНК локализуется вблизи поверхности градиента сахарозы, из которого ее выделяли и очищали фенольно-детергентным способом. Связанную с мембранами ДНК получали путем осторожного растворения осадка в буфере Л с 1% додецилсульфатом Na (ДС) 20 мин. при 50° и 2 часа при 20°, после этого добавляли NaOH до конечной концентрации 0,3 мол/л (~рН 12,8). Седиментационные свойства связанной с мембранами и свободной ДНК анализировали в щелочном градиенте сахарозы. В качестве контроля (моногомная линейная ДНК) использовали ДНК, выделенную из зрелых частиц фага $T4$.

По 0,2 мл раствора ДНК наслаивали на 5–20% (вес/объем) градиент сахарозы (4,8 мл), приготовленный на буфере Л с 0,5% ДС, 0,1 М NaCl и 0,3 М NaOH, центрифугировали при 25° и 56 000 g 120 мин. на ультрацентрифуге АС-60. Фракции собирали со дна пробирки, нейтрализовали, осаждали ТХУ. Осадок собирали на миллипоровые фильтры АУФС, отмывали 5% ТХУ и определяли радиоактивность на приборе ПП-8. Коэффициент седиментации рассчитывали по описанному методу (6).

На рис. 1 представлены результаты ультрацентрифугирования в щелочном градиенте сахарозы ДНК фага Т4, связанной с мембранами клеток



Рис. 3

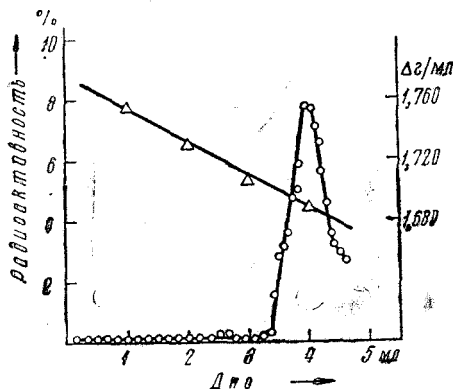


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость скорости осаждения быстро седиментирующей ДНК, выделенной из мембранной фракции клеток на 5 мин. инфекции, от множественности заражения фагом Т4г⁺. S — средний коэффициент седиментации БС-ДНК

Рис. 4. Распределение C¹⁴-ДНК, не связанной с мембранами клеток, на 5 мин. инфекции в щелочном градиенте сахарозы

E. coli K12(λ). У фага дикого типа на 5 мин. инфекции обнаруживается ДНК, седиментирующая быстрее, чем моногеномная линейная ДНК из зрелых фаговых частиц (рис. 1а). К 8 мин. инфекции количество быстро седиментирующей ДНК (БС-ДНК) уменьшается и основная масса ДНК представлена молекулами с коэффициентом седиментации, близким для одногеномной линейной формы ДНК (рис. 1б). В отличие от дикого фага, у мутанта БС-ДНК не образуется (рис. 1в).

ДНК с высокой скоростью седиментации может быть представлена ковалентно замкнутыми циркулярными и (или) конкатамерными структурами. Для выяснения третичной структуры БС-ДНК из мембранной фракции клеток, зараженных фагом Т4г⁺, на 5 мин. инфекции выделяли ДНК фенольно-детергентным способом, обрабатывали ее проназой и центрифугировали после повторной очистки в градиенте плотности CsCl с этидиумбромидом (8). При этом установлено, что плотность БС-ДНК равна плотности линейных структур фаговой ДНК (рис. 2). Это говорит об отсутствии ковалентно замкнутой циркулярной ДНК. Если фракция БС-ДНК представлена полигеномными конкатамерными структурами из родительских ДНК фага, то, по-видимому, должна существовать прямая зависимость между длиной конкатамеров и множественностью заражения клеток фагом Т4г⁺. В опытах с различной множественностью заражения показано, что при увеличении множественности инфекции увеличивается и коэффициент седиментации БС-ДНК (рис. 3). Следовательно, БС-ДНК представляет собой конкатамерные структуры, величина которых зависит от количества молекул фаговой ДНК, проникших в клетку.

Полигеномные конкатамерные структуры образуются, вероятно, в результате ассоциации родительских молекул ДНК с мембранами до начала интенсивной репликации ДНК. Не связанная с мембранами ДНК не образует конкатамерных форм (рис. 4). Эти данные позволяют предпола-

гать, что БС-ДНК представляет собой предрепликативное состояние ДНК. С началом репликации в ДНК образуются разрывы, в результате чего конкатамеры в щелочной среде фрагментируются (рис. 16).

Таким образом, у фага Т4 до начала репликации ДНК ассоциируется с мембранами и образуются предрепликативные полигеномные конкатамеры. Образование конкатамеров контролируется генами *g11*.

Филиал Института химической физики
Академии наук СССР
Черноголовка Моск. обл.

Поступило
4 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Sauerbier, P. M. Stirling et al., J. Virology, 4, 742 (1969). ² Ю. Н. Зограф, В. Г. Никифоров, М. Ф. Шемякин, Молек. биол., 1, 94 (1967).
³ A. D. Kaiser, F. Jacob, Virology, 4, 509 (1957). ⁴ T. Ogawa, J. Tomizawa, J. Mol. Biol., 23, 225 (1967). ⁵ J. D. Karam, Biochem. and Biophys. Res. Commun., 37, 416 (1969). ⁶ C. R. McEwen, Anal. Biochem., 20, 114 (1967). ⁷ A. Garen, Virology, 14, 151 (1961). ⁸ R. Radloff, W. Bauer, J. Vinograd, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1514 (1967).