

Т. Н. КОПЫЛОВА-СВИРИДОВА, Л. П. ТИХОМИРОВА, А. П. ЧЕРНОВ,  
В. И. ТАНЯШИН, В. М. КРЮКОВ, И. ФОДОР, Н. И. МАТВИЕНКО,  
академик А. А. БАЕВ

### ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТА ДНК, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕН РЕПРЕССОРА ФАГА $\lambda$

Вопрос о структурных основах биологической активности ДНК продолжает оставаться в центре внимания исследователей. В частности представляет интерес вопрос выделения у фагов фрагментов ДНК, несущих определенные гены, и поиск систем трансформации для анализа их инфекционности. Имея это в виду, мы проводили исследование на хорошо изученном объекте — фаге  $\lambda$  и его мутантах.

В настоящее время известно несколько рестрикционных эндонуклеаз, фрагментирующих ДНК фага  $\lambda$ . Одной из них является эндонуклеаза RI из клеток *Escherichia coli*, обладающих фактором множественной лекарственной устойчивости (*EcoRI*). Эндонуклеаза *EcoRI* выделена нами из клеток *E. coli* NM 182, производного от штамма *E. coli* K 1100, по методу Йошимори (<sup>1</sup>). ДНК фага  $\lambda$   $CI_{857}S_7$ , меченную <sup>3</sup>H, обрабатывали эндонуклеазой в условиях полного гидролиза. Условия инкубации: реакционная смесь (100 мкл) содержала 50 мМ трис-НСI, рН 7,5, 9 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl, 14 мкг ДНК и 15 мкл фермента. Инкубацию проводили при 37° в течение 10 час. Реакцию останавливали охлаждением до 0° и добавлением ЭДТА до 60 мМ. Электрофоретическое разделение полученных фрагментов вели в 1% агарозе в стеклянных трубках (диаметр 0,6 см, длина 10 см) в Е-буфере (40 мМ трис-ацетат, рН 7,9, 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ ЭДТА) при 20°. Нижний конец трубки закрывали нейлоновой сеткой. Пробу вводили в гель в течение 30 мин. при напряжении 20 в. При этом устанавливался ток около 1 ма. Разделение вели 6 час. при 40 в (ток ~2 ма). По окончании электрофореза извлеченный из трубки гель окрашивали в течение 30 мин. в водном растворе этидиумбромиды (5 мкг/мл). Фотографирование проводили в проходящем ультрафиолете с красным фильтром. Фотопленка 90 ед. ГОСТ. Время экспозиции 2 мин.

Электрофоретическое разделение фрагментов представлено на рис. 1А, 3А. В основном электрофореграмма соответствует полученной в (<sup>2</sup>), где проводили электрофоретическое разделение фрагментов в градиентном полпакриламидном геле. На основании сравнения картин электрофоретического разделения гидролизатов ДНК фага дикого типа и делеционных мутантов и электронной микроскопии фрагментов Аллет расположил фрагменты вдоль генной карты фага  $\lambda$  (рис. 1Б). Мы также провели сравнительное изучение картин электрофоретического разделения гидролизатов ДНК фагов  $\lambda CI_{857}$ ,  $\lambda b_2$  и  $\lambda i434$  (рис. 2). Видно, что в гидролизате ДНК фага  $\lambda i434$  отсутствует фрагмент 2. Так как ДНК гибридного фага  $\lambda i434$  отличается от ДНК дикого типа  $\lambda$  только районом иммунитета, можно полагать, что ген  $CI$  находится во фрагменте 2. На основании сравнения картин электрофоретического разделения, полученных Аллетом и нами, а также определения локализации фрагмента, соответствующего области иммунитета, можно расположить полученные нами фрагменты вдоль генной карты (рис. 1, 3А). Разделение высокомолекулярного фрагмента на два в нашем случае, по-видимому, связано с большей разрешающей способностью электрофореза в агарозном геле. Один из этих фрагментов,

по-видимому, представляет фрагмент f1, а другой f1 и f6, соединенные за счет липких концов.

Несмотря на свою привлекательность, метод делеционного картирования разрывов, производимых рестриктазой, имеет один существенный недостаток: он не универсален, поскольку требует большого набора делеционных мутантов, что доступно не для всех объектов. Даже для фага  $\lambda$  Аллету с сотрудниками не удалось картировать места разрывов на ДНК гибридного фага  $\lambda$ i21. Несомненно, этот метод трудно будет применять для картирования разрывов эндонуклеазами рестрикции, производящими значительно большее число разрывов, чем EcoRI. В связи с этим мы считали необходимым разработать систему анализа биологической активности

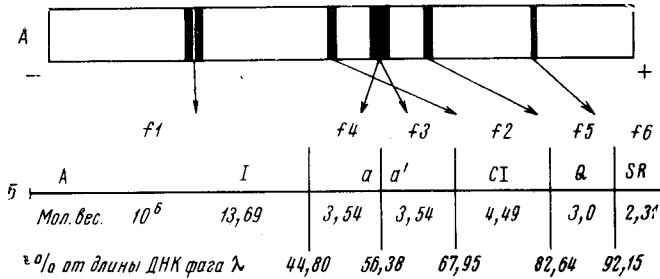


Рис. 1. Расположение фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , полученных действием эндонуклеазы EcoRI в условиях полного гидролиза, вдоль генной карты. А — электрофоретическое разделение фрагментов ДНК фага  $\lambda$ CI<sub>857S7</sub>; при полном гидролизе EcoRI; В — места разрывов на молекуле ДНК фага  $\lambda$  согласно Аллету и др. (2)

фрагментов ДНК, позволяющую определить локализацию генов в том или ином фрагменте.

В настоящее время известно несколько методов трансфекции и трансформации, с помощью которых определяют инфекционную активность ДНК фага  $\lambda$ . Трансфекция ДНК успешно осуществляется в сферопластах, при этом эффективность инфекционности в присутствии протаминсульфата достигает  $1 \cdot 10^{-2}$  инфекционных центров на 1 молекулу ДНК (3, 4). Однако процесс получения сферопластов довольно трудоемкий, и, кроме того, метод дает плохо воспроизводимые результаты. Более простой и воспроизводимой является CaCl<sub>2</sub>-зависимая система трансфекции (5), но эффективность инфекционности в этом случае ниже и составляет  $10^{-5}$ — $10^{-4}$  инфекционных центров на 1 молекулу ДНК. Во всех применяемых системах трансфекции инфекционной активностью обладают только нативные молекулы ДНК.

В системе трансформации инфекционны как нативные молекулы, так и фрагменты ДНК. До недавнего времени считалось, что трансформация ДНК фага  $\lambda$  возможна только по методу, разработанному Кайзером (6), в которой инфекционная активность достигает  $1 \cdot 10^{-2}$  инфекционных центров на 1 молекулу ДНК. В системе Кайзера инфекционностью обладают как целые молекулы ДНК, так и половинки и более мелкие фрагменты, но обязательным условием инфекционности является наличие липкого конца (7).

Для идентификации фрагментов, полученных после действия на ДНК фага  $\lambda$  рестриктазы EcoRI с использованием генетических маркеров, необходимы системы трансформации, где бы инфекционной активностью обладали фрагменты из внутренних участков молекулы ДНК.

Нами разработана система трансформации ДНК фага  $\lambda$  в CaCl<sub>2</sub>-обработанных клетках, предварительно зараженных фагом-помощником. Клетки E. coli QD5003 выращивали в Р-среде (8) при 37° до концентрации  $2 \cdot 10^8$

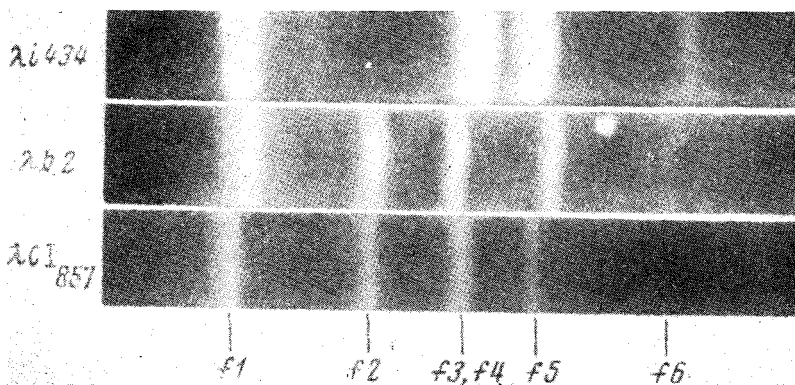


Рис. 2. Разделение в агарозном геле продуктов гидролиза ДНК различных мутантов фага  $\lambda$

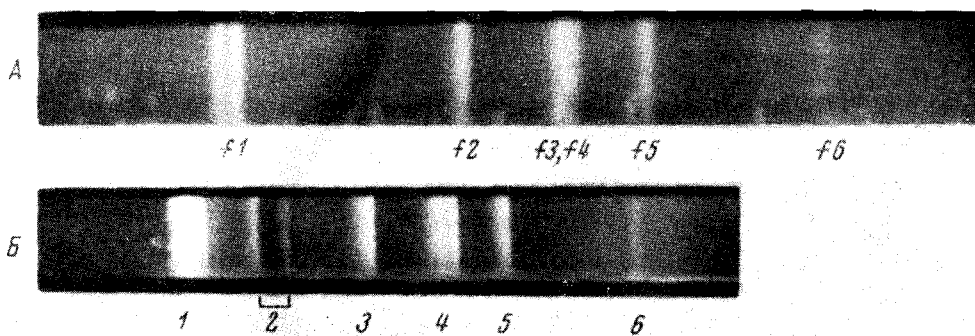


Рис. 3. Фрагменты ДНК фага  $\lambda CI_{837}S_7$ , полученные при различной степени гидролиза. А — условия полного гидролиза; В — частичный гидролиз при трехкратном уменьшении количества фермента. Цифрами указаны зоны, вырезанные для опытов по трансформации (см. рис. 4)

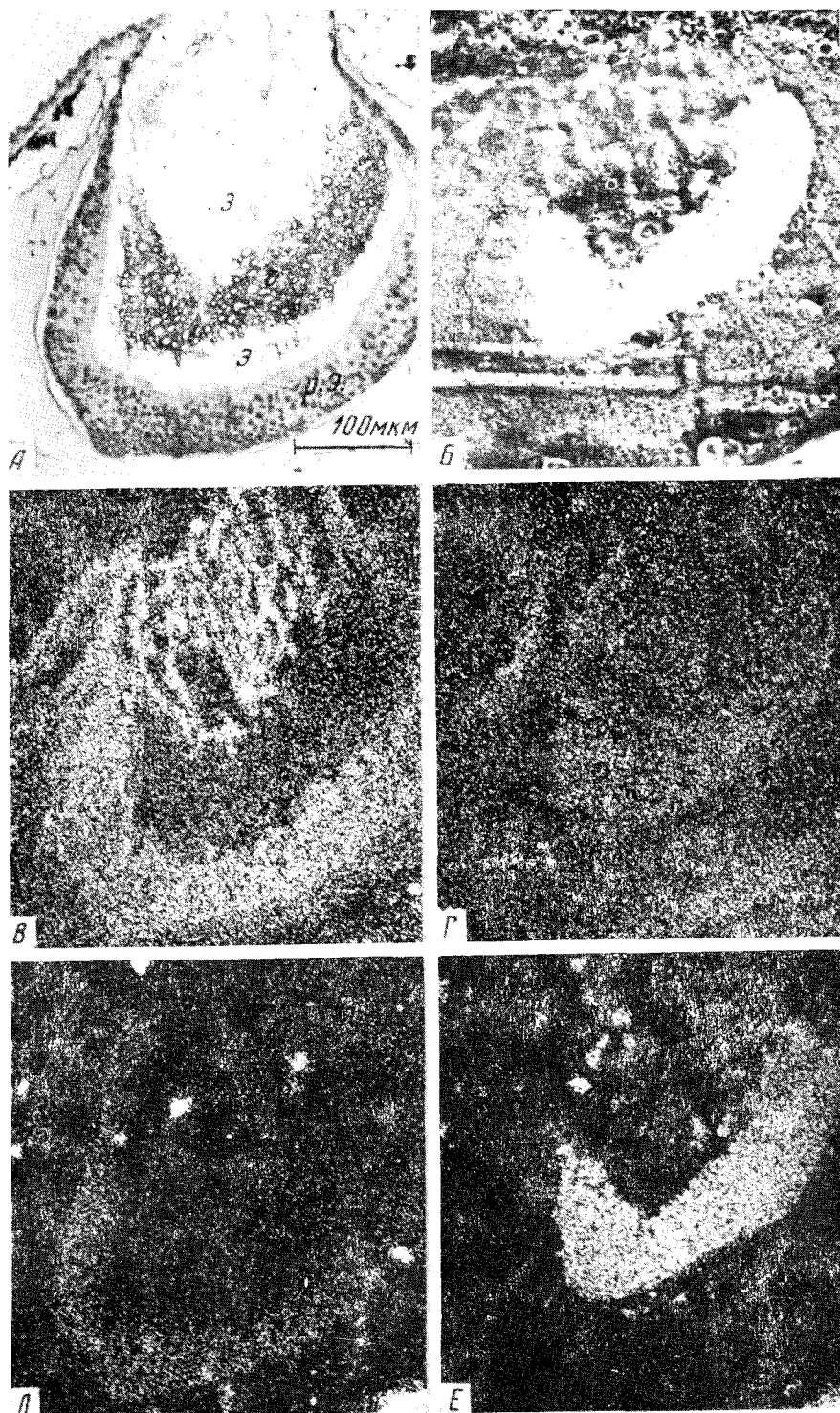


Рис. 1. Участок среза утрикулуса лягушки. А — фотография в световом микроскопе. В — изображение во вторичных электронах. В — Е — в характеристических лучах вольфрама (В), натрия (Г), фосфора (Д), кальция (Е); о — отоолиты, э — эндолимфа, р.э. — рецепторный эпителий

в 1 мл. Суспензию клеток охлаждали в ледяной бане и заражали фагом-помощником с множественностью инфекции, равной 10. В качестве фага-помощника использовали гибридный фаг  $\lambda$ i434, несущий ts-мутацию (ct68) в гене репрессора, и мутацию S<sub>7</sub>, блокирующую лизис непермиссивных клеток. Адсорбция фага длилась 10 мин. при 0°, после чего следовала инкубация при 37° в течение 5 мин. Дальнейшую обработку клеток хлоридным кальцием проводили согласно методике Мандела (5). Подобраны оптимальные условия трансформации. К 0,2 мл полученных клеток добавляли 0,1 мл ДНК (0,3—0,7 мкг/мл) в 0,05 M NaCl, 0,01 M трис, рН 7,5. Смесь выдерживали 2 мин. в ледяной бане, а затем инкубировали при 37° в течение 20 мин. Посевы проводили двухслойным методом с индикаторной культурой E. coli QD5003 ( $\lambda$ i434).

Таблица 1

Биологическая активность ДНК фага  $\lambda$  в различных системах анализа инфекционности

ДНК	Эффективность инфекционности			
	без фага-помощника *	относительная инфекционность	с фагом-помощником *	относительная инфекционность
Нативная	2,9 · 10 <sup>4</sup>	1	6,9 · 10 <sup>6</sup>	1
Денатурированная	0	0	4,3 · 10 <sup>3</sup>	0,0006
Фрагменты (P=0,9 атм.)	2,0 · 10 <sup>3</sup>	0,069	4,3 · 10 <sup>3</sup>	0,62
Фрагменты (P=1,5 атм.)	0	0	3,4 · 10 <sup>5</sup>	0,05

Примечание. Денатурация ДНК проводилась в 0,1 M NaOH в течение 5 мин. при 30°. Нейтрализацию проводили 0,1 M HCl после охлаждения в ледяной бане. ДНК фрагментировали 20-кратным пропусканием через капилляр диаметром 140 мкм, длиной 7 мм при указанном давлении (P).

\* Число инфекционных центров на 1 мкг ДНК.

В табл. 1 сравниваются данные, полученные в системах инфекционности клеток, обработанных CaCl<sub>2</sub>, с фагом-помощником и без фага-помощника для нативной ДНК, денатурированной ДНК и фрагментов ДНК. Эффективность инфекционности в этой системе для нативных молекул ДНК повышалась по сравнению с методом трансфекции (в CaCl<sub>2</sub>-обработанных клеток) на 2 порядка и составляла 6,9 · 10<sup>6</sup> инфекционных центров на 1 мкг ДНК. Денатурированная ДНК не инфекционна в системе без фага-помощника; незначительная инфекционная активность денатурированной ДНК, обнаруженная в системе с фагом-помощником, по-видимому, может быть обусловлена присутствием нативных молекул. Нельзя исключить также, что в системе с фагом-помощником низкой инфекционностью обладают однопитевые молекулы. Фрагментация ДНК при давлении 0,9 атм, по-видимому, не приводит к разрыву всех молекул, что обеспечивает остаточную инфекционную активность 7,5% в системе без фага-помощника. Повышение инфекционности той же ДНК в системе с фагом-помощником до 63% нельзя объяснить только более высокой инфекционностью целых молекул в этой системе. Фрагментация ДНК при давлении 1,5 атм., по-видимому, приводит к разрыву всех молекул, так как инфекционности в системе без фага-помощника не наблюдается совсем. 5% инфекционность в системе с фагом-помощником тех же фрагментов свидетельствует о том, что эта система действительно является системой трансформации.

В дальнейших опытах мы попытались идентифицировать фрагменты, полученные при неполном гидролизе рестриктазой EcoRI ДНК фага

$\lambda$ Cl<sub>857</sub>S<sub>7</sub>, меченной тритием (с активностью 27000 имп/мкг·мин). При сравнении с картиной полного гидролиза обнаружено (рис. 3Б) появление двух дополнительных полос промежуточных продуктов в области больших молекулярных весов. Полосы вырезали, элюировали 0,05 М NaCl, 0,01 М трис, рН 7,5. В элюате с каждой полосы определяли концентрацию ДНК по радиоактивности и трансформирующую активность по гену С1. На по-

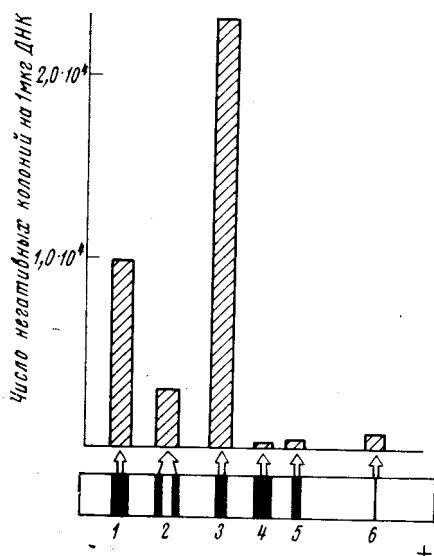


Рис. 4. Трансформирующая активность по гену С1 продуктов неполного гидролиза ДНК фага  $\lambda$ Cl<sub>857</sub>S<sub>7</sub>

ДНК разного молекулярного веса, содержащих район иммунитета. Эти данные свидетельствуют о том, что с помощью электрофореза в 1% агарозе получают гомогенные фракции фрагментов ДНК фага  $\lambda$  и что в системе CaCl<sub>2</sub>-обработанных клеток, инфицированных фагом-помощником, осуществляется трансформация фрагментами ДНК из внутренних участков молекулы.

Таким образом, все фрагменты, содержащие области молекулы, по которым имеются хотя бы условно летальные мутации, в принципе могут быть идентифицированы, что и предполагается провести в дальнейшем.

Авторы выражают признательность К. Муррею (К. Murray) за любезное предоставление штамма бактерий *E. coli* NM182 и В. Ксензенко за помощь в экспериментах.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР  
Пуцдино-на-Оке

Поступило  
14 X 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. N. Yoshimuri, Ph. D. Thesis, Univ. California, 1974. <sup>2</sup> B. Allet, P. G. N. Jepsen et al., Nature, v. 241, 5385, 120 (1971). <sup>3</sup> R. Benzinger, I. Kleber, R. Huskey, J. Virology, v. 7, 5, 646 (1971). <sup>4</sup> W. Wackernagel, Virology, v. 48, 1, 94 (1972). <sup>5</sup> M. Mandel, A. Higa, J. Molec. Biol., v. 53, 1, 159 (1970). <sup>6</sup> A. D. Kaiser, In: Methods in Enzymology, v. 12, Part B, 877 (1968). <sup>7</sup> A. D. Kaiser, R. B. Inman, J. Molec. Biol., v. 13, 1, 78 (1965). <sup>8</sup> A. D. Kaiser, J. Molec. Biol., v. 4, 4, 275 (1962).