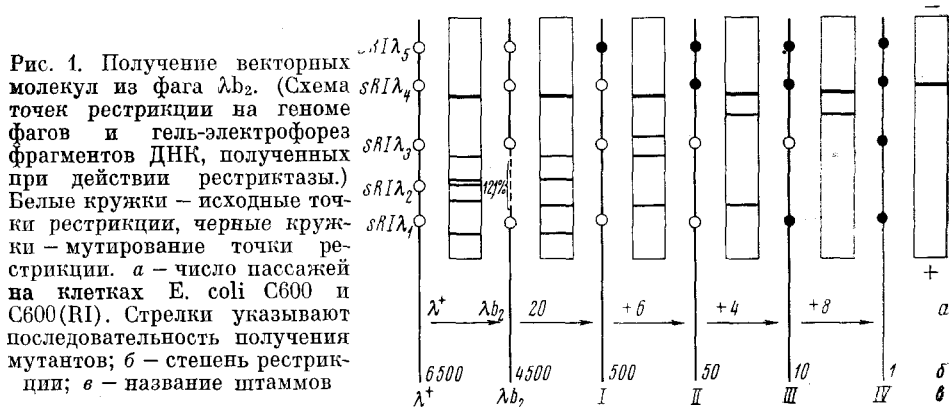


Л. П. ТИХОМИРОВА, Л. Л. ПЕТРОВСКАЯ, В. И. ТАЯШИН,
А. С. СОЛОНИН, Н. И. МАТВИЕНКО, академик А. А. БАЕВ

ГИБРИДНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК ФАГА λ И ПЛАЗМИДЫ Col E1

Рекомбинантные молекулы могут быть получены *in vitro* путем объединения фрагментов ДНК разного происхождения, полученных под действием рестриктаз. Рестриктаза EcoRI используется для этих целей наиболее успешно, поскольку она дает довольно большие фрагменты ДНК с «липкими» кончиками. В качестве векторной молекулы удобно использовать ДНК фага λ , поскольку в его геноме имеется несущественный участок, который может быть заменен чужеродным фрагментом ДНК. Несущественный участок содержит 3 точки рестрикции эндонуклеазой EcoRI



(1). Если в результате обработки рестриктазой и последующего сплавления фрагментов удалить несущественный участок, то можно получить фag, обладающий способностью к направленному переносу в клетки *E. coli* чужеродной генетической информации. Однако у фага λ имеются 2 точки рестрикции в существенной части генома. Таким образом, для реализации потенциальных векторных свойств фага λ необходимо получить мутанты по этим двум рестрикционным точкам. В конце 1974 г. такие мутанты были выделены в ряде лабораторий (1-3) и было показано, что они способны включить в свой геном не только бактериальные, но и эукариотные гены.

В нашей работе использован мутант λb_2 , имеющий делецию в несущественной части генома, составляющую 12,1% от длины всей молекулы ДНК. Путем длительного попеременного пассирования на штамме С600 и штамме, содержащем рестриктазу, С600(RI) был получен мутант λIII , который сохранил только одну рестрикционную точку (рис. 1). Если исходный мутант λb_2 имеет степень рестрикции 4500, то у полученного мутанта она уменьшилась до 10. В опытах по изучению влияния рестриктазной обработки на совместную трансформацию по двум маркерам в системе обработанных хлористым кальцием клеток с фагом-помощником показано, что оставшаяся точка рестрикции в мутанте λIII расположена в несущественной части генома, слева от области иммунитета. Проверено по 104 негативных колонии трансформантов, выросших на газоне клеток *E. coli*, лизогенных по фагу 434 и, следовательно, образованных фагами с

иммунитетом λ I. При использовании помощника $\text{susA19}\lambda$ 434 и ДНК фагов λ III или λ IV, обработанной рестриктазой, по 53 колонии были образованы фагами sus^+ ; при использовании же ДНК λ III, обработанной рестриктазой, все фаги имели генотип sus^- . Когда же использовался помощник λ 434 susR60 и те же ДНК, все фаги были sus^+ .

Следовательно, обработка рестриктазой полностью нарушает совместную трансформацию по маркерам λ I и susA19 , в то время как совместная трансформация по маркерам λ I и susR60 остается на прежнем уровне. Обработка рестриктазой никак не влияет на совместную трансформацию с помощью ДНК мутанта λ IV, не имеющего точек рестрикции, который был выделен после 8 дополнительных пассажей на клетках *E. coli* C600 и

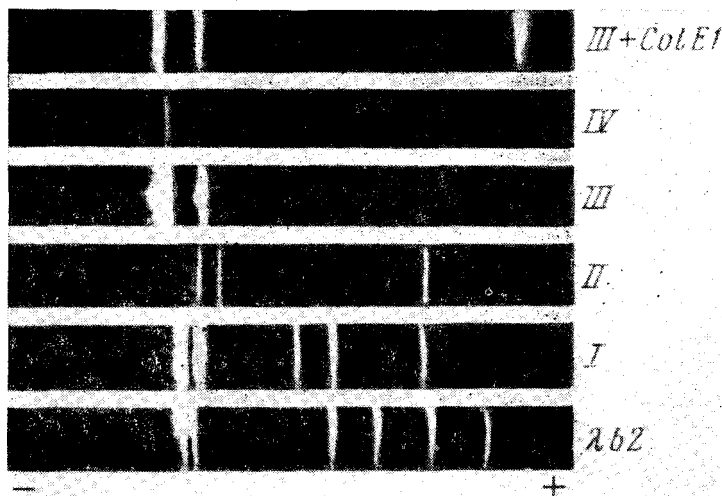


Рис. 2. Агарозные гели фрагментов ДНК λ b₂, мутантов по рестрикции и гибрида с Col E1, полученных действием рестриктазы EcoRI

E. coli C600(RI) (рис. 1). Электрофорез в агарозном геле (⁴) фрагментов, полученных при действии рестриктазы (рис. 2), показывает, что у мутанта λ III остается точка рестрикции SRI λ ₃.

Пирофосфатная инаktivация — чувствительный тест на изменение количества ДНК в головке бактериофага (⁵). Поскольку исходный мутант λ b₂ и мутант λ IV, свободный от точек рестрикции, имеют одинаковую скорость пирофосфатной инаktivации, можно сделать заключение, что устранение точек рестрикции не связано с возникновением больших делеций.

Для проверки возможности включения чужеродной ДНК в геном фага λ III в качестве модели была взята меченая плазмида Col E1 из клеток *E. coli* P678 (Col E1). Эписома F⁺, присутствующая в этом штамме, была предварительно элиминирована обработкой акридином оранжевым. Отсутствие эписомы F⁺ проверяли по чувствительности к фагу MS2. Плазмиду Col E1 выделяли по методу Гири и др. (⁶) из клеток, инкубированных с хлорамфениколом, и дальнейшей очисткой равновесным центрифугированием в градиенте CsCl (⁷). После рестриктазной обработки и совместного отжига в присутствии полинуклеотидлигазы фага T4 фрагментов λ III и ДНК Col E1 была проведена трансфекция клеток *E. coli* C600, отмытых в растворе CaCl₂ (⁴) с целью получения жизнеспособных клонов фага с гибридной ДНК (рис. 3).

Из 37 исследованных клонов обнаружено 4 клонa, неспособных размножаться на штамме *E. coli*, дефектном по ДНК-полимеразе I, что могло свидетельствовать о нарушении гена *red*, в районе которого расположена рестрикционная точка SRI λ ₃ (⁴). Полученные мутанты были подвергнуты

дальнейшему анализу на включение дополнительного фрагмента ДНК и на наличие дополнительных точек рестрикции, появляющихся при интеграции. Изучена степень рестрикции и пирофосфатной инактивации (45°, 60 мин.) клонов фага, неспособных размножаться на штамме *pol A*.

Фаг	λ CI857	λb_2	λ III ₁₀	λ III ₁₆	λ III ₄₀	λ III ₄₁
Степень рестрикции	6400	4500	52	1	120	1
Инактивация пирофосфатом	$3,48 \cdot 10^{-3}$	$2,32 \cdot 10^{-1}$	$2,26 \cdot 10^{-2}$	—	$3,31 \cdot 10^{-2}$	—

У клонов λ III₁₀ и λ III₄₀ в результате обработки появились дополнительные точки рестрикции, у клонов же λ III₁₆ и λ III₄₁ точка рестрикции утрачена. Поскольку инактивация фага пирофосфатом усиливается с увеличением содержания ДНК в головке бактериофага ⁽⁵⁾, можно сделать заключение, что ДНК фагов λ III₁₀ и λ III₄₀ содержит меньше ДНК, чем фаг

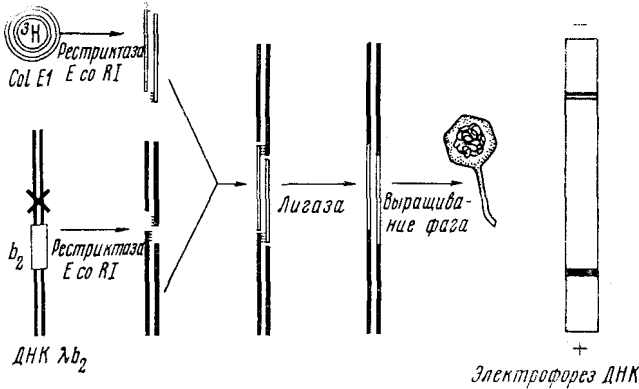


Рис. 3. Интеграция ДНК плазмиды Col E1 в геном фага λ III

λ CI857 с нормальной длиной молекулы. Следовательно, ни фаг λ III₁₀, ни фаг λ III₄₀ не содержат полноценной плазмиды, поскольку молекулярный вес плазмиды Col E1 $4,2 \cdot 10^6$, а размер делеции λb_2 $3,6 \cdot 10^6$, и в случае интеграции целой плазмиды инактивация гибридного фага была бы более сильной, чем фага λ CI857.

Из мутанта λ III₁₀ была выделена ДНК, обработана рестриктазой *EcoRI*, и фрагменты разделены электрофоретически. Как и следовало ожидать, обнаружено 3 фрагмента (рис. 2). 2 из них соответствуют фрагментам мутанта λ III и один имеет молекулярный вес $\sim 2 \cdot 10^6$ дальтон.

Гибридизацией меченой ДНК плазмиды Col E1 с иммобилизованной на нитроцеллюлозных фильтрах ДНК фага λ III₁₀ показано, что дополни-

Т а б л и ц а 1

Гибридизация меченых ДНК плазмиды Col E1 и ДНК фага λ CI857 с иммобилизованной на фильтрах ДНК фагов λb_2 и λ III₁₀

Иммобилизованная ДНК	Меченая ДНК	Гибридизация, имп/мин	
		опыт 1	опыт 2
λb_2	λ CI857C ¹⁴	48102 (60,5)	49 627 (61,5)
λb_2	Col E1 H ³	79 (0)	91 (0)
λ III ₁₀	Col E1 H ³	1186 (23,0)	1234 (23,7)

П р и м е ч а н и е. Числа в скобках — процент гибридизации.

тельный фрагмент имеет плазмидное происхождение (табл. 1). Гибридизация выполнена по методу ⁽⁸⁾.

Можно выдвинуть 2 гипотезы о причине включения фрагмента плазмиды, а не целой плазмиды в геном фага λ III₁₀. 1. Наличие в ДНК фага фрагмента чужеродной ДНК, способного к автономной репликации, делает фаг нежизнеспособным или мешает его размножению, так что при выращивании фага в высоком титре селективируются варианты с делецией в плазмидном фрагменте и вытесняют исходный фаг с целой плазмидной ДНК. 2. При больших концентрациях фермента, которые были использованы в работе, нельзя полностью исключить менее специфические разрывы, в препаратах рестриктированных ДНК. Согласно информации, полученной от К. Мари, в препаратах эндонуклеазы EcoRI присутствует другая эндонуклеаза EcoRI', узнающая последовательность Pu Pu AT Pu Pu. В таком случае после рестрикции должны быть более короткие фрагменты, чем целая плазмидная ДНК. Возможно, они способны интегрироваться в геном фага λ . Мутанты фага с утратой точки рестрикции, возможно, возникают таким же путем за счет объединения фрагментов, возникших при менее специфичных разрывах.

Авторы выражают благодарность А. Чернову за помощь в проведении электрофоретического разделения фрагментов, А. Д. Кайзеру — за любезное предоставление штаммов фага λ b₂ и λ CI857, И. А. Хмель — за штамм E. coli P678 (Col E1), К. Муррею — за штамм E. coli K1100-NM182.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушкино Московской обл.

Поступило
22 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. E. Murray, K. Murray, Nature, v. 251, 476 (1974). ² A. Rambach, P. Tiollais, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 3927 (1974). ³ M. Thomas et al., ibid., v. 71, 4579 (1974). ⁴ Т. Н. Копылова-Свиридова и др., ДАН, т. 220, № 3, 211 (1975). ⁵ I. C. Parkinson, R. I. Huskey, J. Mol. Biol., v. 56, 369 (1971). ⁶ P. Guerry et al., J. Bacteriol., v. 116, 1064 (1973). ⁷ V. Hershfield et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 3455 (1974). ⁸ М. Грин и др., Методы исследования нуклеиновых кислот, М., «Мир», 1972, стр. 383.