

Л. И. ЛИ, В. И. ТАНЫШИН, Н. И. МАТВИЕНКО,
академик А. А. БАЕВ

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ФАГА Т4 ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ *EcoRI*

Использование высокоспецифичных эндонуклеаз рестрикции и, в частности, эндонуклеазы *EcoRI* привело к крупным успехам в изучении структуры вирусных и фаговых ДНК (¹⁻⁴). Представляло значительный интерес использовать эндонуклеазу *EcoRI* для изучения структуры ДНК фага Т4, одного из самых генетически изученных объектов. Однако, как следует из приводимых ниже данных, ДНК фага Т4⁺ не расщепляется *EcoRI*. Мы предположили, что резистентность этой ДНК к гидролизу связана с наличием в ней остатков глюкозилированного 5-оксиметилцитозина. Мутанты *gt* фага Т4 не способны индуцировать синтез α - (или) β -глюкозилтрансфераз и, как следствие этого, имеют полностью или частично неглюкозилированные остатки оксиметилцитозина в ДНК (⁵). Мутанты *gt* не растут на обычных хозяевах для Т-четных фагов, т. е. на тех штаммах, которые имеют генотип *g6*⁺, *g2,4*⁺. Эти гены контролируют рестрикцию неглюкозилированных мутантов фага Т4. Мутанты *gt* растут, однако, на *Shigella dysenteriae* и на мутантах *E. coli* В и К12 с генотипом *g6*⁻, *g2,4*⁻ (⁶). В работе использовались следующие штаммы фага, любезно предоставленные доктором Ю. П. Винецким: Т4⁺, α *gt* 57 β *gt* 14, α *gt*⁺ β *gt* 14, α *gt* 57 β *gt*⁺, α *gt* 57 β *gt* am 10, α *gt* am 8 β *gt* am 10. ДНК мутантов α *gt* 57 β *gt* 14 и α *gt* am 8 β *gt* am 10 содержали менее 5% остатков глюкозилированного 5-оксиметилцитозина (⁷).

Фаги выращивали на *E. coli* К12 *g6*⁻, *g2,4*⁻. Для выделения эндонуклеазы *EcoRI* использовали штамм *E. coli* NM182, производный от штамма *E. coli* 1100. Фермент выделяли по методу Йошимори (⁸).

ДНК фагов Т4, меченных ³²P, обрабатывали эндонуклеазой в условиях полного гидролиза. Реакционная смесь содержала 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 9 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 3,15 мкг ДНК и 3 мкл. фермента. Инкубацию проводили при 37° в течение 30 мин. Реакцию останавливали охлаждением до 0° и добавлением ЭДТА до конечной концентрации 60 мМ. Электрофоретическое разделение полученных фрагментов вели в 0,8–1,5% агарозе в стеклянных трубках (диаметр 0,6 см, длина 10 см) в Е-буфере (40 мМ трис-ацетат, pH 7,9, 5 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА) при 20°. Нижний конец трубки закрывали нейлоновой сеткой. Пробы вводили в гель в течение 30 мин. при напряжении 20 в. При этом устанавливался ток около 0,5 ма на трубку. Разделение вели 12–15 час. при 20 в (ток ~0,5 ма на трубку). По окончании электрофореза извлеченный из трубки гель окрашивали в течение 15–20 мин. в водном растворе этидиумбромид (10 мкг/мл). Фотографирование проводили в проходящем ультрафиолете с красным фильтром. Фотопленка 65 ед. ГОСТ. Время экспозиции 2 мин.

На рис. 1А представлены результаты электрофоретического фракционирования фрагментов полного гидролиза ДНК фага α *gt* am 8 β *gt* am 10. Картина гидролиза хорошо воспроизводилась и не менялась при добавлении 5-кратного избытка фермента. На этом же рисунке приведена картина расщепления *EcoRI* ДНК фага λ b₂, фрагменты которой использовались в качестве маркеров при определении молекулярного веса продуктов расщепления ДНК (⁹) (табл. 1).

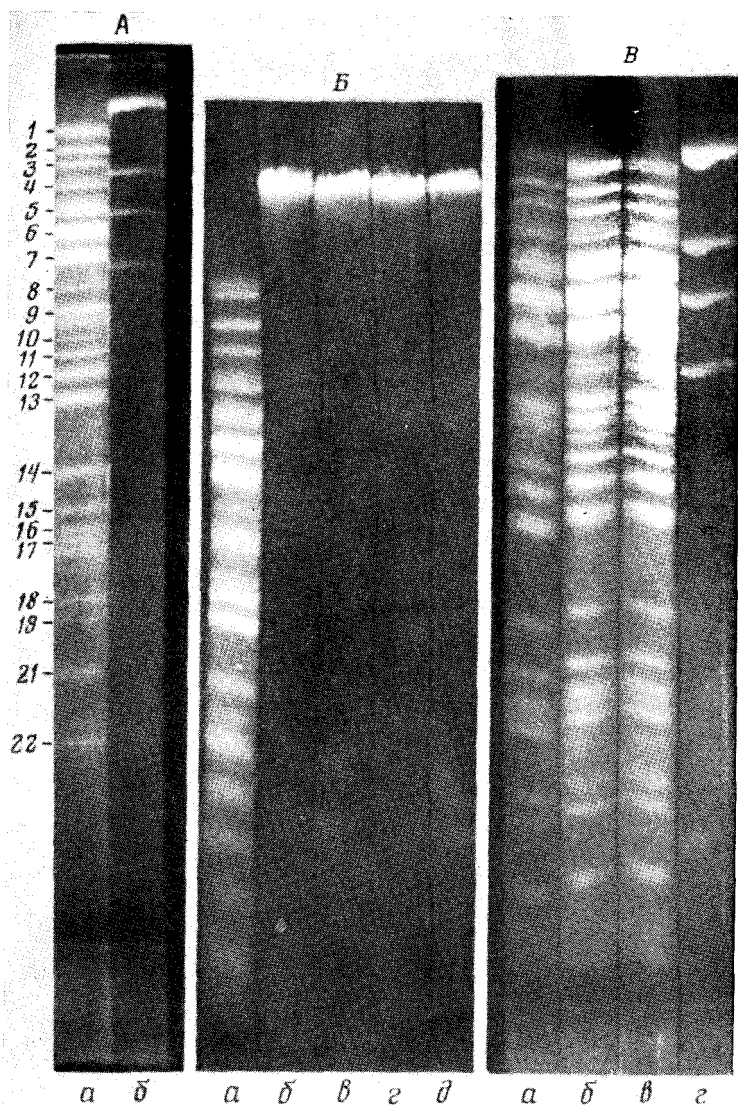


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК gt -мутантов и ревертантов $T4 \alpha gt \beta gt$ из гидролизата $EcoRI$. Условия гидролиза и проведения электрофореза приведены в тексте. А: а — ДНК фара $\alpha gt am 8 \beta gt am 10$, б — ДНК λb_2 . В: а — ДНК фара $\alpha gt am 8 \beta gt am 10$, б — ДНК $T4$ дикого типа, в — ДНК $\alpha gt^+ \beta gt^{14}$, г — ДНК $\alpha gt^{57} \beta gt^+$, д — ДНК фара $\alpha gt am 8 \beta gt am 10$, необработанная ферментом $EcoRI$ (контроль). В: а — ДНК фара $\alpha gt am 8 \beta gt am 10$, б — ДНК фара $\alpha gt^{57} \beta gt^{14}$, в — ДНК фара $\alpha gt^{57} \beta gt am 10$, г — ДНК фара λb_2 . 1–22 — зоны фракционирования

На рис. 1Б приведены данные электрофоретического разделения продуктов гидролиза ДНК фагов α gt57 β gt⁺ (⁴) и α gt⁺ β gt14 (³). В обоих случаях подавляющее количество нанесенного материала расположено вблизи зоны интактной ДНК (см. контроль: необработанная ферментом ДНК фага α gtam8 β gtam10 (⁵) и обработанная ферментом ДНК фага T4⁺ (²)), в то время как в зоне фрагментов (контроль: обработанная

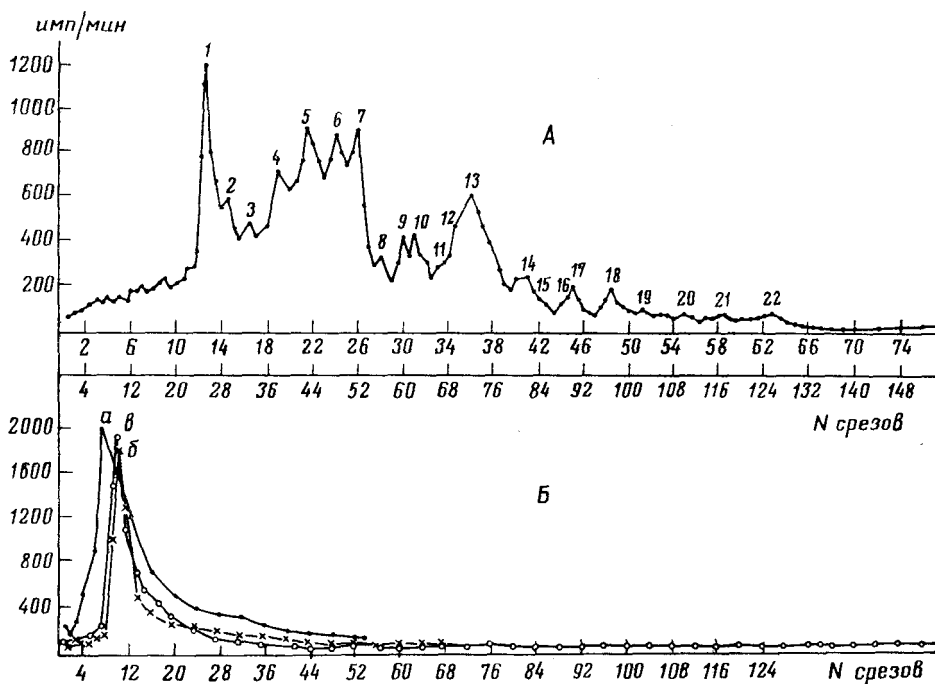


Рис. 2. Электрофорез ³²P фрагментов ДНК фага T4, полученных при гидролизе эндонуклеазой EcoRI. Гели разрезали на 0,5 мм диски, высушивали на фильтрах и просчитывали в спинтиляционном счетчике «Intertechnik». А — ДНК фага α gtam8 β gtam10, обработанных ферментом, Б: а — ДНК фага T4 дикого типа, обработанная ферментом, б — ДНК фага α gtam8 β gtam10, не обработанная ферментом (контроль), в — ДНК фага α gt⁵⁷gt⁺, обработанная ферментом. 1–22 — то же, что на рис. 1. На рис. 2А верхняя абсцисса — в мм.

EcoRI ДНК фага T4 α gtam8 β gtam10 (¹)) никакого материала не обнаруживается. Согласно данным работы (⁷), α -глюкозилтрансфераза может гликозилировать до 80% остатков 5-оксиметилцитозина, а β -глюкозилтрансфераза до 100% остатков. Наличие хотя бы одной мутационно не измененной трасферазы оказывается достаточным для полного предотвращения действия EcoRI.

На рис. 1Б представлены картины разделения фрагментов негликозилированных ДНК трех различных мутантов. Обращает на себя внимание практически полное совпадение характера разделения и величины образующихся фрагментов.

На рис. 2 представлена картина электрофоретического разделения фрагментов ³²P-ДНК фага T4 α gtam8 β gtam10. Можно было бы ожидать, что с уменьшением молекулярного веса должно наблюдаться пропорциональное снижение радиоактивности (если бы каждый пик был представлен индивидуальным фрагментом). Однако для ряда пиков с более низким молекулярным весом наблюдаются непропорционально высокие значения величин радиоактивности. Логичным объяснением такого положения является допущение наличия в пиках (полосах геля) двух или нескольких фрагментов с близкими значениями молекулярного веса.

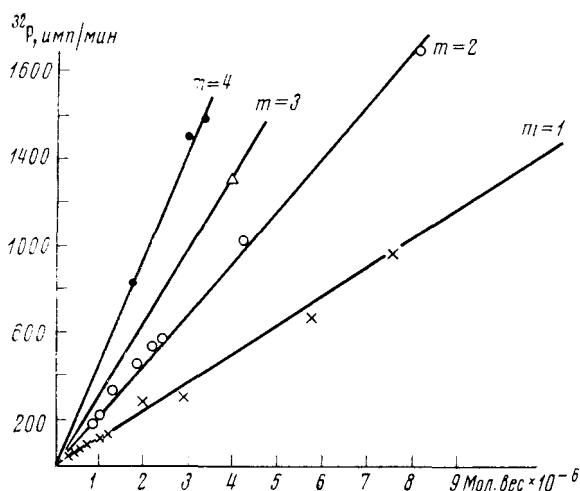


Рис. 3. Соотношение числа импульсов в зонах и молекулярного веса фрагментов в них. Зоны, пронумерованные на рис. 14, вырезали, высушивали и просчитывали в сцинтилляционном счетчике

относительной подвижности фрагментов при использовании в качестве стандарта фрагментов гидролизата EcoRI ДНК фага λb_2 (*) (рис. 3), приводит к следующему заключению.

Зоны 2, 3, 8, 11, 15, 16, 19, 20, 21 и 22 содержат по одному фрагменту, зоны 1, 4, 9, 10, 12, 14, 17 и 18 содержат по два фрагмента, зона 5 — три

Когда все видимые на ультрамикроскопе полосы были вырезаны (см. рис. 1) и определена их радиоактивность (табл. 1) оказалось, что некоторые из них содержат в 2, 3 или 4 раза большую метку, чем если бы они были представлены индивидуальными фрагментами. Действительно, для такого значительного числа фрагментов (41) высока вероятность получения фрагментов близких молекулярных весов, не разделяющихся в описываемых условиях.

Сопоставление данных абсолютного числа импульсов в каждой зоне со значениями молекулярного веса, определенными по

Таблица 1

Электрофоретическая подвижность фрагментов ДНК α gtam8 β gtam10 и их молекулярный вес

№ зоны	l/l_c^*	Мол. вес **	Число имп/мин	Мол. вес, исходя из числа имп/мин	Число фрагментов в зоне
1	0,52	$8,2 \cdot 10^6$	1880	$15,7 \cdot 10^6$	2
2	0,63	$7,6 \cdot 10^6$	980	$8,1 \cdot 10^6$	1
3	0,72	$5,7 \cdot 10^6$	680	$5,6 \cdot 10^6$	1
4	0,83	$4,7 \cdot 10^6$	1020	$8,5 \cdot 10^6$	2
5	0,94	$3,9 \cdot 10^6$	1300	$10,8 \cdot 10^6$	3
6	1,04	$3,3 \cdot 10^6$	1580	$13,1 \cdot 10^6$	4
7	1,13	$3,0 \cdot 10^6$	1500	$12,5 \cdot 10^6$	4
8	1,21	$2,8 \cdot 10^6$	320	$2,7 \cdot 10^6$	1
9	1,30	$2,4 \cdot 10^6$	560	$4,7 \cdot 10^6$	2
10	1,35	$2,2 \cdot 10^6$	530	$4,4 \cdot 10^6$	2
11	1,44	$1,95 \cdot 10^6$	280	$2,3 \cdot 10^6$	1
12	1,50	$1,84 \cdot 10^6$	450	$3,75 \cdot 10^6$	2
13	1,57	$1,73 \cdot 10^6$	820	$6,8 \cdot 10^6$	4
14	1,80	$1,26 \cdot 10^6$	340	$2,8 \cdot 10^6$	2
15	1,87	$1,16 \cdot 10^6$	130	$1,07 \cdot 10^6$	1
16	1,91	$1,08 \cdot 10^6$	120	$1,0 \cdot 10^6$	1
17	1,96	$1,03 \cdot 10^6$	200	$1,7 \cdot 10^6$	2
18	2,11	$0,84 \cdot 10^6$	180	$1,5 \cdot 10^6$	2
19	2,24	$0,71 \cdot 10^6$	90	$0,75 \cdot 10^6$	1
20	2,39	$0,58 \cdot 10^6$	70	$0,60 \cdot 10^6$	1
21	2,54	$0,48 \cdot 10^6$	70	$0,60 \cdot 10^6$	1
22	2,72	$0,38 \cdot 10^6$	60	$0,50 \cdot 10^6$	1

* l — расстояние, пройденное зоной (фрагментом), l_c — расстояние, пройденное фрагментом С из ДНК λb_2 (*).

** Определение молекулярного веса по относительной подвижности фрагмента проводилось как описано в работе (*).

фрагмента и зоны 6, 7 и 13 — по четыре фрагмента. Общая сумма всех фрагментов составляет 112 млн дальтон.

Путем скрещивания штамма *E. coli* NM 182(RI) с реципиентным штаммом K 12 r6⁻, r2, 4⁻/6 были выделены рекомбинанты K 12 r6⁻, r2, 4⁻(RI/6), ограничивающие фаг λB₂ в 2000 раз. При посеве на рекомбинант мутантов фага T4 с негликозилированной и частично гликозилированной ДНК их эффективность посева была не ниже, чем в штаммах K 12 r6⁻, r2, 4⁻/6. Это может быть следствием интенсивной рекомбинации фрагментов ДНК, полученных в клетке под действием эндонуклеазы *EcoRI* с образованием полноценных молекул, что весьма вероятно, если учесть высокий уровень полинуклеотидлигазной активности, индуцируемой фагом T4. Возможно также, что в инфицированных клетках имеется какой-то механизм, ингибирующий нуклеазу или защищающий негликозилированную ДНК от действия фермента.

Проведенная работа позволяет сделать следующие заключения: 1) негликозилированная ДНК фага T4 гидролизуеться эндонуклеазой *EcoRI* с образованием 41 фрагмента с молекулярным весом от 8,2 до 0,38 млн дальтон, в то время как ДНК дикого типа не расщепляется ферментом; 2) нормальное функционирование любой из двух гликозилтрансфераз полностью защищает ДНК фага T4 от действия *EcoRI*.

В дальнейшем предполагается использовать электрофорез в градиентных гелях с целью разделения фрагментов, попадающих в одну зону при данных экспериментальных условиях, для уточнения их молекулярного веса и генетической идентификации. Интересно было бы также выяснить механизм «спасения» негликозилированной ДНК фага T4 *in vivo* в штамме K 12 r6⁻, r2, 4⁻(RI/6).

Авторы выражают глубокую благодарность А. П. Чернову за предоставление калибровочной кривой для измерения молекулярного веса фрагментов и Н. А. Матвеевой за техническую помощь в работе.

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

Поступило
28 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. I. Danna, G. H. Sack, D. Nathans, J. Mol. Biol., v. 78, 363 (1973). ² U. Pettersson, C. Mulder *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 200 (1973). ³ B. Allet, P. G. N. Jeppesen *et al.*, Nature, v. 241, 122 (1973). ⁴ M. H. Edgell, M. C. A. Hutchison, M. Sclair, J. Virol., v. 9, 574 (1972). ⁵ H. R. Revel, S. E. Luria, Ann. Rev. Genet., v. 4, 177 (1970). ⁶ H. R. Revel, Virology, v. 31, 688 (1967). ⁷ C. P. Georgopoulos, H. R. Revel, Virology, v. 44, 271 (1971). ⁸ R. N. Yoshimori, Thesis Univ. California, 1971. ⁹ R. Helling, H. N. Goodman, H. W. Boyer, J. Virol., v. 14, 1235 (1974).