

УДК 575.1.113+576.858.9

БИОХИМИЯ

И. ФОДОР, Т. Н. КОНЫЛОВА-СВИРИДОВА,
академик А. А. БАЕВ

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО ФАКТОРА, ПОВЫШАЮЩЕГО ИНФЕКЦИОННОСТЬ ДНК БАКТЕРИОФАГА λ

При нормальном внутриклеточном цикле развития ДНК фага λ обнаружены кольцевые и тацдемные конкатемерные формы (¹), инфекционность которых в CaCl_2 -зависимой системе трансфекции существенно ниже активности зрелых мономерных молекул (²). Известно, что биологическую активность ДНК фага λ можно исследовать в системах трансфекции и трансформации *Escherichia coli* (^{3, 4}). В экстракте индуцированных лизогенных клеток *E. coli* обнаружена активность, повышающая инфекционность ковалентно сшитых кольцевых молекул ДНК фага λ в системе трансформации с фагом-помощником (⁵). Авторы предположили, что повышение биологической активности кольцевых форм ДНК связано со специфическим нуклеазным действием, превращающим кольцевые молекулы в инфекционные линейные мономеры и получившим название тер-функции.

Таблица 1

Очистка белкового фактора, стимулирующего инфекционность
ДНК фага λ

Этапы очистки	Общее количество белка, мкг	Общая активность, %	Степень очистки
Центрифугирование 100000g, 60 мин.	75000	100	1
Система Альбертсона	15000	80	4
Аффинная хроматография на ДНК-полиакриламидной колонке	—	45	
Концентрирование на мембране UM10	20	30	1100

В настоящей работе описано выделение белкового фактора, стимулирующего инфекционность конкатемерных форм ДНК фага λ . При этом обнаружено, что стимулирующий эффект вызван не образованием мономеров (тер-функцией), а участием фактора во внутриклеточном развитии ДНК на каких-то других стадиях развития вириона.

Фактор выделяли из лизогенной культуры *E. coli* HB 100 ($\lambda \text{Cl}_{857} \text{S7}$). Выращивание бактерий в объеме 150 мл, индукцию фага и разрушение клеток проводили как описано (⁶). От клеточных остатков освобождались центрифугированием в течение 1 часа при 100 000 g. Надосадочный раствор концентрировали в 3 раза на мембранном фильтре UM 10 фирмы Амикон. От нуклеиновых кислот освобождались 2–3-кратным фракционированием в двухфазной системе Альбертсона (⁶). Верхнюю фазу полиэтиленгликоля 6000, содержащую белки, после длительного диализа против 0,01 M трис, pH 8,0, 0,01 M 2-меркаптоэтанол, 0,1 mM ЭДТА пропускали через полиакриламидно-агарозную колонку с иммобилизованной нативной ДНК фага λ , как описано (⁷). Фактор элюировали 0,35 M NaCl в указанном выше буферном растворе, концентрировали в 5–6 раз на мембране UM 10 и хранили при -20° с 50-процентным глицерином (табл. 1).

Электрофорез очищенного фактора в 10-процентном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ⁽⁸⁾ обнаружил одну полосу, содержащую более 90% всего белка и соответствующую молекулярному весу 150 000 дальтон.

В опыте брали ковалентно сшитые конкатемерные ДНК, полученные как описано ранее ⁽²⁾. Обычно использовали тримеры ДНК фага λ_{i434} , в некоторых опытах тетрамеры и пентамеры. При обработке ДНК белковым фактором к 0,1 мл ДНК (при концентрации 1,0 мкг/мл) добавляли 0,01 мл белкового фактора. Остальные условия согласно методике ⁽³⁾.

Таблица 2

Стимулирование очищенным фактором инфекционности различных форм ДНК фага λ_{i434} в системах трансфекции и трансформации

Форма λ_{i434} ДНК	Трансфекция			Трансформация		
	фактор (—)	фактор (+)	кратность увеличения	фактор (—)	фактор (+)	кратность увеличения
Мономеры	9350	12920	1,4	62400	320000	5,1
Несшитые линейные конкатемеры	6870	8460	1,2	48800	264000	5,4
Сшитые линейные конкатемеры	15	367	24,5	3650	22150	6,0

Измерение инфекционности ДНК проводили в CaCl_2 -зависимой системе трансфекции ⁽⁹⁾ и в системе трансформации с фагом-помощником ⁽⁹⁾. Численные значения инфекционности ДНК соответствуют количеству образовавшихся негативных колоний фага на чашку без разведения.

При добавлении неочищенного экстракта инфекционность сшитых кольцевых форм ДНК в CaCl_2 -зависимой системе трансфекции повышалась с 220 колоний до 3010 колоний на чашку, а инфекционность сшитых конкатемерных форм ДНК с 38 до 1537 колоний на чашку. При этом инфекционность мономеров составляла 18 250 негативных колоний на чашку. Необходимо отметить, что от опыта к опыту кратность повышения инфекционности конкатемерных ДНК после добавления фактора не была постоянной. Максимальные величины при этом не превышали 10% инфекционности мономерных ДНК.

Мы сравнили повышение инфекционности различных форм ДНК под действием очищенного фактора в двух системах (табл. 2). Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что в системе трансфекции сшитые конкатемеры активируются фактором эффективнее (в 24,5 раз) по сравнению с мономерами (1,4 раз) или несшитыми конкатемерами (1,2 раз). В отличие от системы трансфекции в опытах по трансформации кратность повышения инфекционности различных форм ДНК была одинаковой (5,1–6,0 раза), что, по-видимому, объясняется различными молекулярными механизмами данных систем.

Для того чтобы выяснить, происходит ли уменьшение молекулярного веса сшитых конкатемерных ДНК после обработки очищенным фактором, пробы до и после обработки фактором центрифугировали в нейтральном градиенте глицерина ⁽²⁾ в роторе SW 501. Однако многочисленные попытки обнаружить разницу седиментационных профилей не привели к успеху. Это свидетельствует о том, что после обработки фактором молекулярный вес ДНК не меняется и, следовательно, не происходит превращения конкатемеров в мономеры. Опыты проводились с $^3\text{H}\lambda\text{Cl}_{857}$ ДНК (с активностью 6×10^4 имп/мкг·мин) и поэтому даже незначительное проявление тер-функции могло быть обнаружено. Отсюда был сделан вывод, что повышение инфекционности сшитых конкатемерных ДНК объясняется не ее

фрагментацией с образованием мономеров (тер-функцией), а другими причинами.

Оценка количества смешанных клонов в опытах с ковалентно сшитыми гибридными конкатемерными ДНК, содержащими молекулы ДНК фагов λ и λ_{1434} , позволяет оценить истинную инфекционность сшитых конкатемеров и исключить вклад примеси мономеров ⁽²⁾. Используя данный генети-

Таблица 3

Наличие смешанных клонов фагов λ и λ_{1434} в системе трансфекции до и после обработки гибридной сшитой конкатемерной ДНК очищенным фактором

Условия опыта	Число про- веренных негативных колоний	Число сме- шанных клонов	Смешанные клоны, %	Условия опыта	Число про- веренных испытанных колоний	Число сме- шанных клонов	Смешанные клоны, %
Без обра- ботки	28	2	7,1	После обработки	11	4	36,0
	88	13	14,6		63	23	37,0
	10	2	20,0		131	62	47,3
	128	26	20,0		29	17	58,0

ческий метод, нами были сравнены количества смешанных клонов в системе трансфекции с сшитыми конкатемерными ДНК, обработанными и необработанными очищенным фактором. Данные ряда опытов приведены в табл. 3. Из данных табл. 3 очевидно, что выделенный фактор существенно повышает выход смешанных клонов. Это доказывает, что повышение инфекционности сшитых конкатемерных ДНК (в данном случае тримеров) под влиянием фактора связано не с отщеплением из конкатемеров мономерных форм, так как в этом случае должно было бы произойти по-

Таблица 4

Кратность увеличения инфекционности сшитой конкатемерной ДНК в системе трансфекции под действием экстракта различных штаммов *E. coli*

	+АТФ		—АТФ	
	37°	70°	37°	70°
HB 1100	0,5	—	4,8	1,0
QD 5003	6,5	0,5	4,0	—
S 600	6,3	28	1,7	—
S 600 (λ sus E)	2,4	11,3	0,57	—
S 600 (λ sus A ₁₉)	3,2	12,3	1,6	—
S 600 (λ +)	3,1	6,3	1,1	—

Примечание. При обработке экстрактом варьировали наличие АТФ и температуру: в одном случае инкубировали при 37°, в другом — при 37°, затем при 70°.

нижение процента смешанных клонов. Принимая во внимание тот факт, что стимулирование фактором мономерных ДНК в системе трансфекции не существенно (табл. 2), предположение об активировании ДНК-связываемым белковым фактором внутриклеточного развития фаговой ДНК нам кажется более предпочтительным, чем его влияние на поступление ДНК в клетку.

В заключение отметим, что аналогичная активность была обнаружена в экстрактах нескольких лизогенных и нелизогенных штаммов *E. coli* (табл. 4). В работе ⁽⁵⁾ показано, что функция продукта гена А АТФ-зависима и чувствительна к прогреву инкубационной смеси при 70°. В наших опытах стимулирующая активность присутствует в экстрактах всех штаммов *E. coli*, приведенных в табл. 4. Для экстрактов штаммов S600 (лизо-

генных и нелизогенных) характерна АТФ-зависимость активации, в отличие от штаммов НВ 1100 и QD 5003. Прогревание при 70° также увеличивает эффективность.

Авторы выражают признательность В. И. Таяншину и А. С. Солонину за препарат полинуклеотидлигазы, О. В. Красниковой и Г. П. Чупраковой за помощь в экспериментах.

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

Поступило
14 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. D. Kaiser, The Bacteriophage Lambda, N. Y., 1971, p. 195. ² И. Фодор и др., Молек. биол., т. 9, 179 (1975). ³ M. Mandel, A. Higa, J. Mol. Biol., v. 53, 159 (1970). ⁴ A. D. Kaiser, Methods in Enzymology, v. 12, 877 (1967). ⁵ J. C. Wang, A. D. Kaiser, Nature New Biol., v. 241, 16 (1973). ⁶ B. M. Alberts, Methods in Enzymology, v. 12A, 566 (1967). ⁷ L. F. Cavalieri, E. Carroll, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 67, 807 (1970). ⁸ U. K. Laemmli, Nature, v. 227, 680 (1970). ⁹ Т. Н. Копылова-Севиридова и др., ДАН, т. 220, 707 (1975).