



УДК 547.963.3

**5'-КОНЦЕВОЙ ОЛИГОПИРИМИДИНОВЫЙ ТЕТРАНУКЛЕОТИД
l-ЦЕПИ ДНК БАКТЕРИОФАГА T7****Свердлов Е. Д., Левитан Т. Л.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Показано, что 5'-концевая последовательность *l*-цепи ДНК фага T7 — d(pT-C-T-C-R...).

В настоящее время большое внимание привлекает структура участков ДНК, которые, взаимодействуя с белками, определяют специфичность процессов, управляемых этой молекулой. К таким участкам относятся, в частности, последовательности, узнаваемые и расщепляемые ферментами, превращающими репликативную форму [1—4] в зрелую ДНК, концевые последовательности которой являются взаимодополняющими частями последовательности, узнаваемой ферментами созревания. В ряде случаев эти последовательности установлены [2].

Репликативная форма ДНК фага T7 — это линейные конкатемеры различной длины [1, 3, 4]. Неясно, как они превращаются в зрелую молекулу, но нельзя исключить, что это превращение включает в себя специфическое ферментативное расщепление и что концевые последовательности ДНК фага T7 — части узнаваемой при этом последовательности.

Последовательности гептануклеотида, находящегося на 3'-конце *l*-цепи [5], тринуклеотида 3'-конца *r*-цепи [6] и 5'-концевых динуклеотидов [7] установлены. В этой статье мы сообщаем о последовательности концевого олигопиримидинового тетрануклеотида, находящегося на 5'-конце *l*-цепи.

Согласно литературным данным [5—7], концевые последовательности ДНК фага T7 выглядят как представлено на рис. 1: 5'-концевая последовательность *r*-цепи — достаточно длинный олигопуриновый нуклеотид, тогда как 5'-концевая последовательность *l*-цепи является как минимум трипиримидиновым олигонуклеотидом. Это обстоятельство позволяет определить концевой олигопиримидин *l*-цепи ДНК фага T7 без предварительного разделения цепей. Действительно, если предварительно дефосфорилированную ДНК T7 фосфорилировать ³²P с помощью полинуклеотидкиназы, метка распределяется между 5'-концевыми звеньями *r*- и *l*-цепей. Однако если теперь такую меченую ДНК подвергнуть расщеплению по методу Бартона [8], то ³²P из концевого пуринового звена *r*-цепи отщепится в виде неорганического фосфата, тогда как ³²P из 5'-концевого пиримидинового звена будет отщепляться в составе олигопиримидинового нуклеотида длиной не менее трех звеньев.

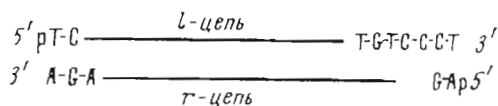


Рис. 1. Концевые нуклеотидные последовательности ДНК фага Т7

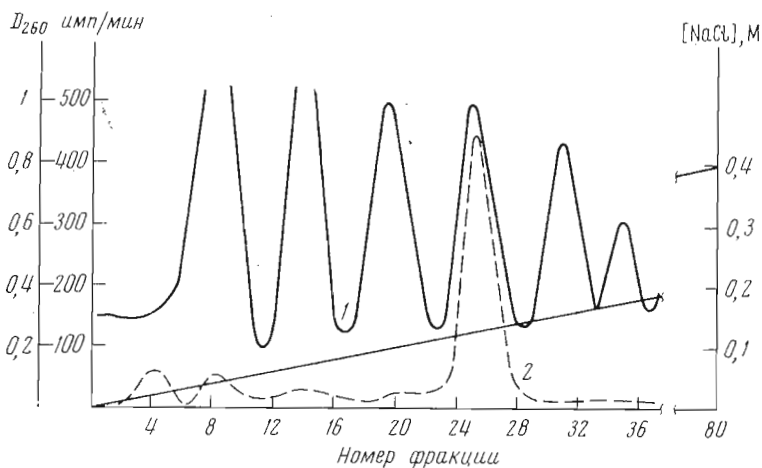


Рис. 2. Определение длины концевого олигопиримидинового нуклеотида ДНК фага Т7. Фосфорилированную ДНК, расщепленную вместе с носителем, хроматографировали на колонке 2×20 см с DEAE-целлюлозой в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine, содержащей 0,05 М ацетат натрия, pH 5,5. Скорость элюции 4,2 мл/ч, объем фракций 1 мл. 1 — D_{260} , 2 — радиоактивность фракций

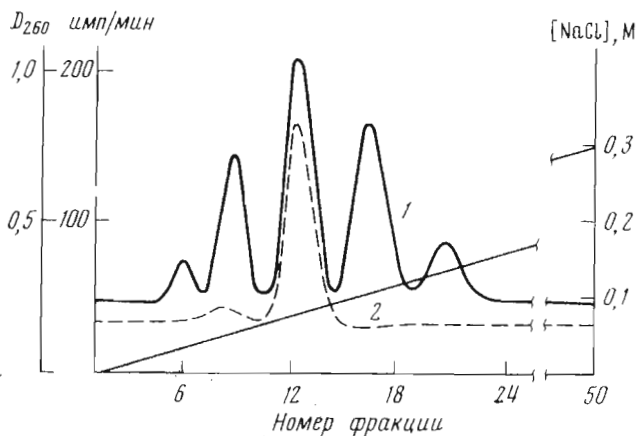


Рис. 3. Определение нуклеотидного состава тетрапиримидинового олигонуклеотида из *l*-цепи ДНК фага Т7. $[^{32}\text{P}]$ олигонуклеотид, полученный при расщеплении $[^{32}\text{P}]$ ДНК Т7, хроматографировали на колонке с DE-32 ($0,3 \times 13$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при pH 3. Скорость элюции 3,6 мл/ч, объем фракций 1 мл. 1 — D_{260} , 2 — радиоактивность фракций

На рис. 2 приведены результаты определения длины олигонуклеотида, содержащего меченый фосфор и получающегося при расщеплении меченой по 5'-концевым звеньям ДНК фага Т7 по методу Бартона. Это определение выполнено путем хроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой в условиях разделения олигопиримидиновых нуклеотидов по длине [9]. Добавленная ДНК-носитель дает при разделении количество материала, достаточное для регистрации оптической плотности вплоть до октауклеотидов, и таким образом обеспечивает систему свидетелями, имеющими длину от одного до восьми звеньев. Основной пик радиоактивности совпадает с пиком, соответствующим тетрауклеотидам (рис. 2). Два других незначительных пика радиоактивности, соответствующие моно- и динуклеотидам, связаны, видимо, с незначительным неспецифическим фосфорилированием.

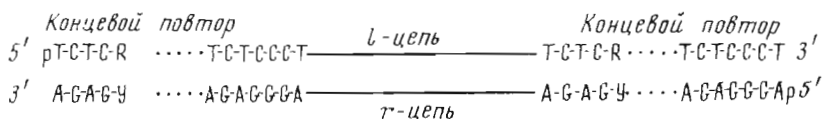


Рис. 4. Структура концевых повторов ДНК фага Т7

Таким образом, концевой олигопиримидиновый нуклеотид *l*-цепи ДНК фага Т7 — тетрауклеотид. Для определения его нуклеотидного состава олигонуклеотид хроматографировали со смесью пиримидиновых тетрауклеотидов различного состава, полученной при расщеплении ДНК спермы лосося по методу Бартона (рис. 3). [³²P] олигонуклеотид хроматографируется совместно с олигонуклеотидом состава d (T₂C₂).

Исходя из известных данных (см. рис. 1), последовательность 5'-концевого олигонуклеотида *l*-цепи — d (рТ — С-Т). В сочетании с уже известными наши данные позволяют вывести последовательность: d(рТ-С-Т-С-Р). С помощью метода определения концевого олигопиримидина легко различить *r*- и *l*-цепи ДНК фага Т7, а также «левую» и «правую» части этой ДНК, получаемые при различного рода расщеплениях ДНК и, в частности, с помощью рестриктаз. Метод более прост, чем определение концевых звеньев, и более специфичен. Так, даже в случае сильно деградированной ДНК со средним $M \sim 13 \times 10^6$, когда определение концевых нуклеотидов невозможно, концевой тетрауклеотид легко идентифицируется, поскольку его количество значительно превышает статистическое.

ДНК фага Т7 содержит концевые повторы [10], благодаря которым она после удаления нескольких десятков нуклеотидов с 3'-конца каждой из цепей может образовывать циклические молекулы. Следовательно, в концевых участках зрелой ДНК фага Т7 имеются, по-видимому, по две одинаковые последовательности (рис. 4), которые ограничивают концевые повторы.

В настоящее время трудно что-либо сказать о механизме образования зрелой ДНК и, в частности, концевых повторов в ней. Однако можно надеяться, что знание полной структуры концевых участков ДНК в значительной степени облегчит решение этой задачи. Работа в этом направлении проводится.

Экспериментальная часть

Бактериофаг Т7 выращивали из одной бляшки, инфицируя культуру *E. coli* В, растущую в среде М9, дополненной 10 г бактотриптона на 1 л. После лизиса бактерий и удаления дебриса центрифугированием при 4500 об/мин в течение 30 мин бактериофаг концентрировали осаждением

полиэтиленгликолем [11]. Полученный осадок суспендировали в 60 мл 0,05 М трис-НСl, 0,005 М MgCl₂, рН 8, и фаг выделяли центрифугированием в ступенчатом градиенте CsCl. Центрифужную пробирку ротора 6 × 100 центрифуги MSE-25 заполняли 20 мл 60%-ного, 20 мл 50%-ного и 20 мл 35%-ного растворов CsCl в 0,01 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, 0,1 М NaCl, рН 7,4. Сверху осторожно наслаивали 30 мл суспензии бактериофага и центрифугировали 3 ч при 15 000 об/мин и 4°. Полосу фага отбирали с помощью шприца, разбавляли вдвое насыщенным раствором CsCl в воде и 10,5 мл такого раствора помещали на дно поликарбонатной пробирки ротора 8 × 25 центрифуги MSE-50. Сверху наслаивали последовательно 5 мл 50%-ного и 5 мл 30%-ного растворов CsCl в этом же буфере [12] и центрифугировали 1 ч при 30 000 об/мин и 10°. Полосу фага отбирали и перед выделением ДНК диализовали против нужного буфера.

ДНК фага Т7 выделяли методом экстракции горячим фенолом. 5 мл фага Т7 с оптической плотностью 7,6 диализовали на холоду в течение 3 ч против раствора, содержащего 500 мл 0,01 М Na₂HPO₄, 0,001 М EDTA, 0,2 М NaCl, рН 7. Суспензию фага и фенол, насыщенный этим же буфером, нагревали до 55° по отдельности и после смешивания равных объемов проводили экстракцию путем слабого размешивания в течение 6 мин при 55°. Смесь охлаждали до 0° и центрифугировали 30 мин в центрифуге К-23 «Janetzki» (ГДР) при 4500 об/мин. Верхний слой ДНК отбирали и диализовали на холоду 30 ч против 1 л стерильного буфера, содержащего 0,01 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, рН 7,5, меняя два раза буфер. Полученную ДНК очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. На дно полиалломерных пробирок ротора SW-27 центрифуги «Beckman L5-50» (США) помещали 5 мл 40%-ного раствора сахарозы в буфере, содержащем 0,01 М трис, 0,001 М EDTA, 0,2 М NaCl, рН 7,4, и наслаивали 30 мл градиента сахарозы (5—20%) в том же буфере. Сверху наслаивали 2 мл раствора ДНК с оптической плотностью 1,65 при 260 нм. Центрифугировали 16 ч при 21 000 об/мин и 4°. Содержимое пробирки разделяли на 9 фракций, осторожно отбирая по 3 мл сверху пипеткой с широким отверстием. Фракции, содержащие ДНК, начинались с середины градиента. Их объединяли и диализовали против 2 л стерильного буфера, содержащего 0,01 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, рН 7,4, меняя буфер через 8 и 20 ч. Полученный раствор концентрировали диализом против 250 мл 20%-ного раствора полиэтиленгликоля («Merck-20 000») в этом же буфере до оптической плотности 1,46.

Дефосфорилирование ДНК проводили с помощью щелочной фосфатазы *E. coli* («Worthington BAPF 3BV» (США)). К 1,5 мл раствора ДНК с оптической плотностью 1,46 в буфере, содержащем 0,01 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, рН 7,4, добавляли 20 мкл раствора фосфатазы (22 МЕ/мл) в 0,01 М трис-НСl, рН 8,2, и термостатировали 1 ч при 37°. Фосфатазу удаляли четырехкратной экстракцией фенолом, насыщенным 0,1 М трис-НСl, рН 7,5 (экстракции проводили путем слабого встряхивания с равными объемами фенола по 15 мин при комнатной температуре). ДНК диализовали при 4° против 2 л буфера, содержащего 0,01 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, рН 7,5, с двумя заменами буфера и затем концентрировали диализом против 30 мл 20%-ного раствора полиэтиленгликоля в буфере, содержащем 0,067 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, рН 8, до оптической плотности 10 (~ 20 ч). ДНК имела отношение $D_{260}/D_{280} = 1,85$ и при центрифугировании в щелочи седиментировала гомогенным пиком.

Полинуклеотидкиназу выделяли по методу [13] из клеток *E. coli* В, инфицированных бактериофагом Т4 ат N 122 [14]. В работе использовали фосфоцеллюлозную фракцию фермента, свободного от эндонуклеазных примесей по тесту сохранения инфекционности циклической ДНК фага 1Ф 7 после инкубации с ферментом.

Аденозин- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ трифосфат — препарат фирмы «Amersham» (Англия) с уд. акт. 16 Ки/ммоль использовали в виде раствора 2,5 мКи/мл.

5'-[³²P]-ДНК Т7 получали следующим образом: к 0,12 мл раствора ДНК (~1 ОЕ₂₆₀) в буфере, содержащем 0,067 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, рН 8, добавляли 8 мкл 1 М трис-НСl, рН 8, 20 мкл 0,1 М β-меркаптоэтанола, 12 мкл 0,1 М MgCl₂, 20 мкл [^γ-³²P]АТР и 20 мкл (1,2 ед. акт. [13]) раствора полинуклеотидкиназы. Смесь инкубировали 14 ч при 0° [15]. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл раствора, содержащего 1,5 М NaCl, 0,001 М EDTA, 0,01 М трис-НСl, рН 9. Меченую ДНК отделяли от [^γ-³²P] АТР гель-фильтрацией на колонке (2 × 20 см), заполненной сефадексом G-100, уравновешенным этим же буфером. В качестве носителя добавляли 18 ОЕ₂₆₀ немеченого АТР. Скорость элюции 0,5 мл/мин. Объем фракций 1,5 мл. Распределение радиоактивности по фракциям определяли по черенковскому излучению. (Во всех последующих опытах радиоактивность измеряли аналогично.) Фракции, содержащие меченую [³²P] ДНК, объединяли и после добавления 80 ОЕ₂₆₀ ДНК спермы лосося в качестве носителя осаждали, добавляя при 0° 1/10 объема 50%-ной трихлоруксусной кислоты. Осадок отделяли центрифугированием, промывали спиртом, эфиром, высушивали и подвергали расщеплению по методу Бартона [8].

Расщепление ДНК до олигопиримидинов. К осадку, полученному, как описано выше, добавляли 0,5 мл воды и 1,42 мл 85%-ной муравьиной кислоты, содержащей 50 мг дифениламина. Смесь инкубировали 18 ч при 37°, после чего разбавляли в 2,5 раза бидистиллированной водой и охлаждали до 0°. Экстракцию муравьиной кислоты проводили водонасыщенным эфиром при 0° до рН 6. После экстракции смесь разбавляли в 3 раза буфером, содержащим 0,05 М ацетат калия в 7 М мочевины, рН 5,5, и нуклеотиды адсорбировали на колонке с DEAE-целлюлозой (DE-32, «Whatman», Англия). Хроматографию олигопиримидиновых нуклеотидов проводили, как показано на рис. 2 и 3.

Авторы благодарят проф. Э. И. Будовского, в лаборатории которого выполнена эта работа, за благожелательное внимание, интерес и постоянную помощь*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wolfson J., Dressler D., Magazin M. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 499—504.
2. Barrell B. G., Clark B. F. C. (1974) Handbook of Nucleic Acid Sequences, p. 99, Joynson-Bruvvers Ltd, England.
3. Kelly T. J., Jr., Thomas C. A., Jr. (1969) J. Mol. Biol., 44, 459—475.
4. Schlegel R. A., Thomas C. A., Jr. (1972) J. Mol. Biol., 68, 319—345.
5. Price S. S., Schwing J. M., Englund P. T. (1973) J. Biol. Chem., 248, 7001—7006.
6. Englund P. T. (1972) J. Mol. Biol., 66, 209—224.
7. Weiss B., Richardson C. C. (1967) J. Mol. Biol., 23, 405—415.
8. Burton K., Petersen G. B. (1960) Biochem. J., 75, 17—27.
9. Mushynsky W. E., Spencer J. H. (1970) J. Mol. Biol., 52, 91—106.
10. Ritchie D. A., Thomas C. A., Jr., McHattie L. A., Wensink P. C. (1967) J. Mol. Biol., 23, 365—376.
11. Yamamoto K., Alberts B., Benzinger R., Lawhorne L., Treiber G. (1970) Virology, 40, 734—741.
12. Thomas M., Davis R. W. (1975) J. Mol. Biol., 91, 315—328.
13. Richardson C. C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 158—165.
14. Hunges S. G., Brown P. R. (1973) Biochem. J., 131, 583.
15. Okazaki R., Hirose S., Okazaki T., Ogawa T., Kurosawa Y. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 62, 1018—1024.
16. Loewen P. C. (1975) Nucleic Acid. Research, 2, 839—852.

Поступила в редакцию
22.VII.1975

* Когда эта статья была подготовлена к печати, появилась публикация Лёвена [16] относительно структуры 5'-концевых участков ДНК фага Т7. Наши результаты совпадают с данными [16], которые получены другими методами.

5'-TERMINAL OLIGOPYRIMIDINE TETRANUCLEOTIDE
OF THE *l*-CHAIN OF T7 DNA

SVERDLOV E. D., LEVITAN T. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

5'-Terminal phosphate groups of the native T7 DNA were removed by treatment with *E. coli* alkaline phosphatase. ³²P-labeled phosphate groups were introduced with the use of ATP and polynucleotide kinase of phage T4. After a cleavage of labeled DNA with wformic acid in the presence of diphenylamine, only one labeled oligonucleotide was found and shown to possess a tetranucleotide d(pT-C-T-Cp) structure. Its location at the 5'-end of the *l*-chain of T7 DNA gives a sequence d(pT-C-T-C-R. . .) for this stretch of DNA.
