



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.96.32.02

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДНК БАКТЕРИОФАГА ϕ X174
ПРИ ПОМОЩИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Верлин Ю. А., Грачев С. А., Колосов М. Н.,
Коробко В. Г., Шингарова Л. Н.

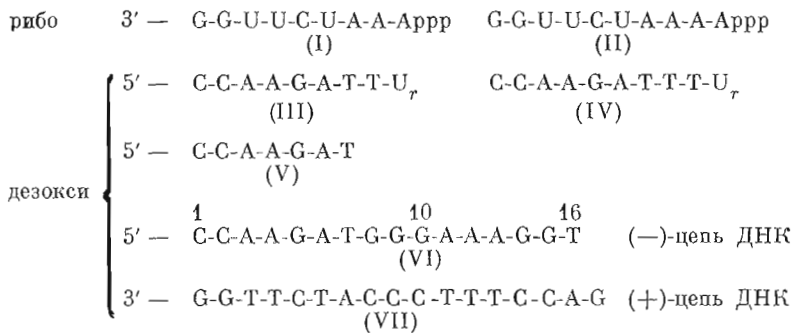
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Один из методов выяснения первичной структуры нетранскрибируемых регуляторных участков ДНК основан на применении синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров (затравок) для направленного ферментативного синтеза одноцепочечной ДНК на комплементарной ей ДНК-матрице [1]. Изучая бактериофаг ϕ X174, мы использовали этот метод для определения нуклеотидной последовательности, предшествующей сайту связывания фаговой ДНК с рибосомой *E. coli* [2]. Настоящая работа была предпринята с целью выяснения тем же способом структуры другого участка ДНК этого фага, а именно промотора гена А.

Ранее Синсхеймером с сотр. было найдено, что в матричных РНК фага ϕ X174 имеются две сходные 5'-концевые последовательности (I) и (II) [3] и что транскрипция, приводящая к их образованию, инициируется на стыке генов Н и А [4]. Поэтому для выяснения структуры промотора гена А мы синтезировали в качестве праймеров 9- и 10-членные дезокси-нуклеотиды (III) и (IV), которые комплементарны соответственно первой и второй упомянутым рибопоследовательностям. Синтез был осуществлен стандартным фосфодиэфирным методом [5], причем из промежуточного защищенного олигонуклеотида в результате деблокирования был получен гептануклеотид (V).

Синтезированный нонануклеотид (III) гибридизовали с одноцепочечной ДНК бактериофага ϕ X174 дикого типа [(+)-цепь] и затем проводили ферментативный синтез комплементарной ДНК [(-)-цепь] с помощью различных неполных наборов дезоксинуклеозидтрифосфатов. Как и в предыдущей работе [2], использованный фермент представлял собой продукт ограниченного протеолиза ДНК-полимеразы I *E. coli*, лишенный 5'-экзонуклеазной активности [6]. Было найдено, что наибольшая элонгация праймера достигается при использовании комбинации dATP + dTTP + + dGTP (последний был [α - 32 P]-меченым). После отделения избытка трифосфатов хроматографией на сефадексе G-50 продукт ДНК-полимеразной реакции выделили электрофорезом в 15% полиакриламидном геле и обработали 0,1 н. NaOH (18 ч при 37°), чтобы отщипить праймер. Однако оказалось, что вещество устойчиво к щелочи, т. е. не содержит рибозвена и, следовательно, не является продуктом непосредственной элонгации нонануклеотида (III).

То же самое вещество было получено и тогда, когда в качестве праймера был взят декануклеотид (IV). Мы установили, что это вещество представляет собой гексадекануклеотид (VI) (его нуклеотидная последовательность 1—14 была определена путем частичного гидролиза фосфодиэстеразой селезенки с последующим двухмерным разделением образовавшихся олигонуклеотидов электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией; последовательность 9—16 установлена аналогичным путем с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда; наличие остатков dG непосредственно за последовательностью 1—7 подтверждено анализом продукта элонгации гептануклеотида (V) при действии dGTP в отсутствие других трифосфатов). Очевидно, что соответствующий участок (+)-цепи фаговой ДНК имеет структуру (VII), так как он должен быть комплементарен гексадекануклеотиду (VI) и содержать dG в положении 17, поскольку (VI) является конечным продуктом ферментативного синтеза в отсутствие dCTP, но может быть элонгирован далее, если реакционная смесь содержит этот трифосфат.



Отсюда следовало, что в описанных выше синтезах (—)-цепи ДНК фага ϕ X174 ДНК-полимераза проявляет обе присущие ей активности — 3'-экзонуклеазную и полимеразную, в результате чего нонануклеотид (III) и декануклеотид (IV) сначала теряют некомплемментарные матрице 3'-концевые звенья (соответственно TU и TTU), а затем наращиваются одинаковой 9-членной последовательностью, начинающейся с GGG. Действительно, элонгация «укороченного» праймера — гептануклеотида (V) при помощи dATP + dTTP + dGTP привела к тому же гексадекануклеотиду (VI), причем в этом случае, благодаря полной комплементарности праймера матрице, реакция протекала даже с большей скоростью и выход продукта синтеза (VI) был примерно в 20 и 100 раз выше, чем при использовании соответственно нонамера (III) и декамера (IV).

Установленная нами последовательность (VII) полностью совпадает с выясненной Сенгером и сотр. [7] для участка 40—56 гена F бактериофага ϕ X174 am3 и перекрывается десятью 3'-концевыми нуклеотидами с фрагментом однонитчатой фаговой ДНК, структура которого была определена ранее [8]. Следует отметить, что во всех случаях при праймировании синтеза (—)-цепи ДНК ϕ X174 олигонуклеотидами (III)—(V) в различных условиях никаких продуктов, не соответствующих последовательности (VII), нами обнаружено не было. Эти результаты показывают, что олигонуклеотиды (III)—(V) специфически связываются с 7-членным участком 50—56 гена F и не гибридизуются с началом гена A, несмотря на то что при этом нонамер (III) мог бы дополнительно образовать две, а декамер (IV) — три уотсон-криковские пары. Остается неясным, вызвано ли это особенностями высшей структуры однонитчатой ДНК ϕ X174 или другими причинами.

Авторы выражают благодарность А. И. Гуревичу (Москва) за препарат ДНК-полимеразы и Ф. Сенгеру (Кембридж, Англия) за неопубликованные данные о нуклеотидной последовательности ДНК ϕ X174 am3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kleid D. G., Agarwal K. L., Khorana H. G. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 5574—5582.
2. Берлин Ю. А., Грачев С. А., Каган М. З., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) *Био-
орган. химия*, **2**, 1273—1275.
3. Grohmann K., Smith L. H., Sinsheimer R. L. (1975) *Biochemistry*, **14**, 1951—1955.
4. Smith L. H., Sinsheimer R. L. (1976) *J. Mol. Biol.*, **103**, 711—735.
5. Kössel H., Seliger H. (1975) in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*,
v. 32, pp. 297—508, Springer-Verlag, Wien — New York.
6. Klenow H., Overgaard-Hansen K., Patkar S. A. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 371—
381.
7. Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchison C. A.,
Sanger F., Slocombe P. M., Smith M. (1976) to be published.
8. Galibert F., Sedat J., Ziff E. (1974) *J. Mol. Biol.*, **87**, 377—407.

Поступило в редакцию
1.XI.1976

THE STRUCTURAL STUDIES OF THE BACTERIOPHAGE ϕ X174 DNA WITH SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES

BERLIN Yu. A., GRACHEV S. A., KOLOSOV M. N.,
KOROBKO V. G., SHINGAROVA L. N.

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

Nonanucleotide d(C-C-A-A-G-A-T-T)-U and decanucleotide d(C-C-A-A-G-A-T-T-T)-U have been chemically synthesized, which are complementary to the 5'-terminal sequences reported by Sinsheimer et al. for mRNAs coded for by bacteriophage ϕ X174 gene A. To sequence an H -- A intercistronic region of the ϕ X174 genome, the synthetic oligonucleotides were used as primers in partial synthesis of the minus-strand of ϕ X174 DNA directed by the wild type phage DNA plus-strand and catalyzed by Klenow's, fragment of *E. coli* DNA polymerase. I. With dATP + dGTP + dTTP as precursors, the two oligonucleotides gave the same product d(C-C-A-A-G-A-T-G-G-G-A-A-A-G-G-T), elongation of the primers having therefore been preceded by elimination of their 3'-terminal nucleotides to form d(C-C-A-A-G-A-T). The results obtained led to the sequence d(G-A-C-C-T-T-T-C-C-A-T-C-T-T-G-G) which is identical to that found by Sanger et al. (to be published) for the 40—56 segment of ϕ X174 am3 gene F but different from the initiation region of gene A.