



УДК 547.962.32.02

EcoRI-НУКЛЕАЗНАЯ КАРТА ДНК ТРАНДУЦИРУЮЩЕГО ФАГА
*λrif^{d47}*Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А.,
Колосов М. Н.Институт¹ биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

ДНК трандуцирующего фага *λrif^{d47}* расщепляется нуклеазой *endoR.EcoRI* на 14 фрагментов (А — К), имеющих следующую величину (кпн) и порядок расположения (начиная с левого конца генома): 4,50(Д) — 2,30(Н₁) — 1,25(Ж) — 2,80(Ф₁) — 1,15(К) — 2,05(Г₁) — 8,65(А) — 2,05(Г₂) — 2,30(Н₂) — 2,40(Г) — 2,80(Ф₂) — 7,15(В) — 5,65(С) — 3,60(Е). Сравнение рестрикционной карты этого фага и фага *λrif^{d18}*, а также результаты опытов по гибридизации с рРНК *E.coli* показывают, что ДНК *λrif^{d47}* содержит находившиеся в бактериальной хромосоме в районе 88' опероны транскрипционно-трансляционного аппарата *E.coli* — гены рРНК (и тРНК^{Glu}), рибосомных белков L1, L11 и L7/L12, фактора элонгации Tu, β- и частично β'-субъединицы РНК-полимеразы.

В 1976 г. С. З. Миндлин и др. получили специализированный трандуцирующий фаг *λ47rif^d*, несущий ген β-субъединицы РНК-полимеразы [1]. Этот фаг, в дальнейшем обозначаемый нами *λrif^{d47}*, сходен с описанным ранее [2] фагом *λcI857sTrif^{d18}* (сокращенно *λrif^{d18}*), который подробно изучен генетически и биохимически. Было установлено, что в фаге *λrif^{d18}* делетирован значительный участок собственной ДНК λ и интегрирован близкий к нему по величине фрагмент ДНК *E. coli*, находившийся в бактериальной хромосоме в районе 79' (т. е. 88' по новой, 100-минутной генетической карте *E. coli* [3]) и содержащий гены 16S-, 23S- и 5S-рРНК, тРНК^{Glu}, рибосомных белков L1, L11 и L7/L12, фактора элонгации Tu, β- и β'-субъединицы РНК-полимеразы [4]. Представлялось вероятным, что те же гены (за исключением части или всего гена *proC*, кодирующего β'-белок РНК-полимеразы, (ср. [1])), присутствуют в фаге *λrif^{d47}*, который, таким образом, может служить источником их получения для структурного и функционального анализа. В связи с этим мы предприняли изучение ДНК фага *λrif^{d47}* с целью выделения из нее специфических фрагментов, содержащих регуляторные участки и структурные гены транскрипционно-трансляционного аппарата *E. coli*.

Мы исследовали расщепление ДНК *λrif^{d47}* рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI*, которая гидролизует ДНК λ на шесть крупных фрагментов [5]. Фаг *λrif^{d47}*, являясь дефектным, размножается в присутствии фага-помощника, от которого лишь незначительно отличается по плотности, и неполностью отделяется при ультрацентрифугировании: препарат ДНК *λrif^{d47}*, выделенный после центрифугирования смеси фагов в течение 48 ч

Сокращения: PIPES — пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфокислота), SDS — додецилсульфат натрия, ТЕАВ — бикарбонат триэтиламония, пп — число нуклеотидных пар в ДНК, кпн — пп в тысячах. Поскольку статья посвящена структуре ДНК, префикс d для краткости всюду опущен.

при 200 000g в равновесном градиенте CsCl, еще содержал около 20% ДНК λ . Поэтому в настоящей работе использовались смеси ДНК λrif^{d47} и λ .

При исчерпывающем гидролизе таких смесей нуклеазой *endoR. EcoRI* (10 ед. акт. фермента на 1 пмоль ДНК, 30 мин при 37°) и последующем электрофорезе в 1% агарозном геле было обнаружено 13 полос рестриктных фрагментов, 7 из которых (А, F, G, H, I, J и К) по своей подвижности отличались от *EcoRI*-фрагментов ДНК λ (рис. 1). Сопоставляя электрофореграммы продуктов *EcoRI*-гидролиза препаратов ДНК различного состава, полученных из трансдуцирующего фага до и после частичного отделения фага-помощника, мы нашли, что 4 других фрагмента образуются как из ДНК λ (ранее они были обозначены D, E, В и F [5]), так и из ДНК λrif^{d47} (фрагменты В, С, D и Е). Таким образом было установлено, что из ДНК λrif^{d47} образуется 11 групп *EcoRI*-фрагментов: от А до К.

Величина этих фрагментов была определена по их электрофоретической подвижности в 0,5% агарозном геле, поскольку известно [8], что в гелях $\geq 0,8\%$ нарушается логарифмическая зависимость между подвижностью и молекулярным весом длинных ДНК. В качестве стандартов нами были использованы фрагменты А—Е ДНК λ ; полученные результаты представлены на рис. 2 и в табл. 1. Следует отметить, что для фрагмента Е ДНК λrif^{d47} , имеющего одинаковую подвижность с фрагментом F ДНК λ , найденная нами величина (3,60 кнп) заметно отличается от найденной ранее для второго из этих фрагментов электрономикроскопически (6,9% длины ДНК λ [5], т. е. 3,25 кнп), но близка к определенной по электрофоретической подвижности в градиентном полиакриламидном геле (7,85% длины ДНК λ [7], т. е. 3,65 кнп).

Для определения числа фрагментов в каждой из групп А—К и выяснения их последовательности в λrif^{d47} в фаговую ДНК и ее фрагменты вводили радиоактивную метку путем достройки «липких» концов с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ и ДНК-полимеразы *E. coli*. Как известно, этот фермент наряду с полимеразной активностью проявляет 3'-экзонуклеазную активность, вследствие чего для синтеза им полинуклеотидной цепи (в данном случае 3'-терминального участка, комплементарного выступающему 5'-концу ДНК) необходим избыток соответствующих трифосфатов. Мы использовали это обстоятельство для того, чтобы избирательно метить в исследуемых фрагментах концы, образовавшиеся при действии рестриктазы *EcoRI*, не затрагивая концов, унаследованных от фаговой ДНК.

В «липкие» концы фаговой ДНК вводили метку с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ в присутствии большого избытка немеченых АТР и ТТР. В этих условиях правый конец фаговой ДНК должен достроиться полностью, а на левом конце должны присоединяться только 4 нуклеотида (TGGA), поскольку радиоактивные G и C (они отмечены звездочками), взятые в виде трифосфатов в небольшом количестве, не могут эффективно



Рис. 1. Электрофорез *EcoRI*-фрагментов в 1% агарозном геле (пластина 200 × 1 мм) в 0,05 М трис-боратном буфере, рН 8,3; 50 В, 20 ч. Приведена фотография (негатив) геля, прокрашенного бромистым этидием: а — фрагменты ДНК λrif^{d47} и λ ; б — фрагменты ДНК λ , 0 — старт

Таблица 2

E *, мм	Радиоактив- ность, имп/мин	Относительная радиоактивность		Число фрагментов
		найденная	ожидаемая 2*	
90	2720	0,55	0,55	1 3*
115	4440	0,90	0,90	1
126	10 335	2,10	2,00	2
140	10 030	2,03	2,00	2
147	5000	1,00	1,10	1
160	8700	1,76	1,55	2 4*
178	5130	1,04	1,00	2 5*
196	9030	1,83	1,80	2
207	3920	0,80	0,90	1
210	8340	1,69	1,80	2
220	8220	1,67	1,80	2
257	5080	1,03	0,90	1
262	4060	0,82	0,90	1

* См. второе примечание к табл. 1.

2* При молярном соотношении ДНК λ — ДНК λrif^{d47} , равном 55:45, и вдвое меньшей радиоактивности терминальных фрагментов по сравнению с остальными.

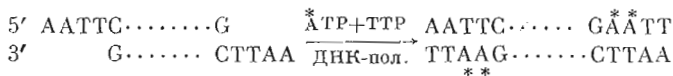
3* Терминальный фрагмент ДНК λ .

4* Один из двух фрагментов является терминальным в ДНК λrif^{d47} .

5* Терминальные фрагменты ДНК λ и λrif^{d47} .

активными, что, вероятно, объясняется присутствием 20% примеси ДНК λ и наличием одноцепочечных разрывов в обоих ДНК*.

Избирательное введение метки в концы, образовавшиеся при действии рестриктазы *EcoRI*, проводили с помощью [α - ^{32}P]АТФ в присутствии большого избытка немеченого ТТР:



В этих условиях концы, обрезанные *EcoRI*, полностью достраиваются, а оба «липких» конца фаговой ДНК не изменяются, так как в реакционной смеси отсутствует GTP (вместе с CTP), без которого не может сохраниться А*, присоединившийся к левому концу фаговой ДНК. В результате фрагменты, образовавшиеся из средней части фаговой ДНК, оказываются мечеными по двум концам, а терминальные фрагменты — по одному концу и, соответственно этому, обладают вдвое меньшей радиоактивностью.

Полученные нами экспериментальные данные приведены в табл. 2. Поскольку некоторые фрагменты ДНК λrif^{d47} (а именно В—Е) по своей электрофоретической подвижности совпадают с фрагментами ДНК λ (соответственно D, E, B и F) и так как расщеплению нуклеазой *EcoRI* подвергалась смесь фаговых ДНК неизвестного состава, необходимо было прежде всего выяснить соотношение ДНК λ и ДНК λrif^{d47} в исследуемой смеси. Это соотношение было определено по радиоактивности двух наибольших фрагментов. Первый из них является терминальным фрагментом ДНК λ , и его молярная радиоактивность должна быть вдвое ниже, чем

* Эти разрывы не имеют принципиального значения для определения положения *EcoRI*-сайтов на карте ДНК λrif^{d47} , но существенно понижают выход рестриктных фрагментов, в особенности коротких, при их препаративном выделении. Поэтому для получения фрагментов F — K исходную ДНК сначала обрабатывали ДНК-лигазой, чтобы ликвидировать одноцепочечные разрывы, и лишь затем подвергали рестрикции. При этом в результате лигазной реакции происходило также сшивание «липких» концов ДНК с образованием циклических и олигомерных молекул, вследствие чего такой прием нельзя было использовать в экспериментах по картированию.

Таблица 3

Обозначение	E *, мм	Величина **, кпм	Составляющие EcoRI-фрагменты
P1	93	18,0	J, F ₁ , K, I ₁ , A, I ₂
P2 ***	95	16,4	B, C, E
P3	97	15,8	J, F ₁ , K, I ₁ , A
P4	102	12,8	B, C и/или I ₁ , A, I ₂
P5 ***	106	10,8	D, H ₁ , J, F ₁
P6 ***	109	9,30	C, E
P7 ***	120	8,00	D, H ₁ , J
P8 ***	130	6,80	D, H ₁
P9	136	6,30	H ₁ , J, F ₁
P10	138	6,00	F ₁ , K, I ₁
P11	148	5,20	J, F ₁ , K и/или G, F ₂
P12	152	4,70	H ₂ , G
P13	162	4,35	I ₂ , H ₂
P14	164	4,05	J, F ₁
P15	168	3,95	F ₁ , K
P16	185	3,20	K, I ₁

* См. второе примечание к табл. 1.

** См. третье примечание к табл. 1.

*** Терминальный фрагмент.

у второго фрагмента, который образуется только из ДНК λ rif^d47 и не является терминальным; поэтому найденное отношение их радиоактивностей 2720 : 4440, равное 0,61, отвечает молярному соотношению фрагментов 1,22, т. е. в исходной смеси содержится 55 % ДНК λ и 45 % ДНК λ rif^d47. В соответствии с этим при расчете относительной радиоактивности всех фрагментов за единицу принята такая величина (4930 имп/мин), по отношению к которой радиоактивность первого, наибольшего фрагмента равна 0,55. Как видно из табл. 2, найденные величины радиоактивности близки к ожидаемым при условии, что фрагменты с подвижностью 90 и 147 мм образуются только из ДНК λ , фрагменты с подвижностью 126, 140, 160 и 178 мм — из ДНК λ (55%) и ДНК λ rif^d47 (45%), а остальные — только из ДНК λ rif^d47. Таким образом, ДНК λ rif^d47 расщепляется нуклеазой *endoR.EcoRI* на 14 фрагментов, число и величина которых приведены в табл. 1.

Для картирования этих фрагментов фаговая ДНК, меченная описанным выше способом, была подвергнута ограниченному гидролизу нуклеазой *endoR.EcoRI* (10 ед. акт. фермента на 1 пмоль ДНК, 1—10 мин при 37°). Среди продуктов частичного расщепления (P1 — P16) пять были радиоактивными (P2, P5, P6, P7 и P8) и, следовательно, содержали концевые фрагменты фаговой ДНК, а остальные 11 были обнаружены после дополнительного введения метки с помощью ДНК-полимеразы и [α -³²P] АТФ + ТТР. Электрофоретическая подвижность и найденная по ней величина всех обнаруженных нами продуктов частичного расщепления ДНК λ rif^d47 нуклеазой *endoR.EcoRI* приведены в табл. 3. Состав этих продуктов установлен путем перебора всех возможных сочетаний продуктов *EcoRI*-фрагментов А—К, перечисленных в табл. 1.

Полученные данные позволяют установить последовательность, в которой *EcoRI*-фрагменты А—К связаны между собой в ДНК λ rif^d47 (см. рис. 3). Концевая последовательность D-H₁-J-F₁ вытекает из величины продуктов частичного гидролиза P8, P7 и P5, содержащих терминальный фрагмент D; ее подтверждает также образование составных фрагментов P9 и P14. Другая концевая последовательность (B-C-E) вытекает из величины продуктов P6 и P2; она полностью согласуется с установленной ранее последовательностью тех же фрагментов в ДНК λ [5]. Величина продуктов частичного гидролиза P16, P15 и P10, содержащих фрагмент К,

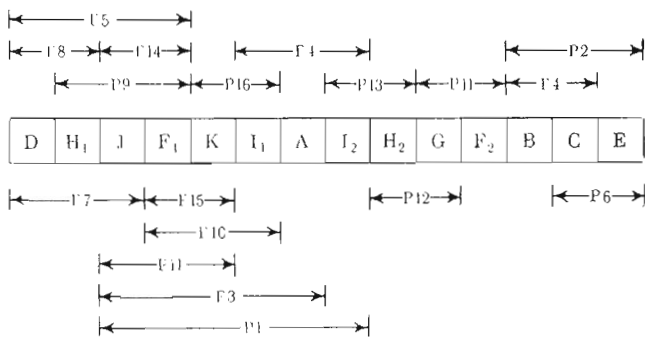


Рис. 3. Схема расщепления ДНК $\lambda rif^d 47$ рестриктазой *EcoRI*. А—К — продукты полного гидролиза, P1—P16 — продукты частичного гидролиза. P4 представляет собой последовательность I₁-A-I₂ или B-C, P11 — J-F₁-K или G-F₂

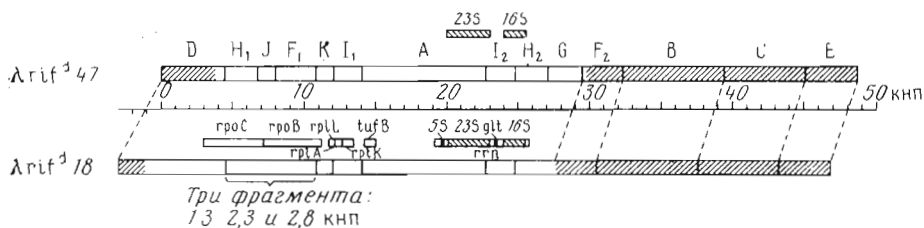


Рис. 4. *EcoRI*-нуклеотидные карты ДНК трансдуцирующих фагов $\lambda rif^d 47$ и $\lambda rif^d 18$. Шкала дана в тысячах нуклеотидных пар (кнп). Собственная ДНК λ заштрихована, трансдуцированная из *E. coli* оставлена светлой. Расположение в $\lambda rif^d 18$ сайтов *EcoRI* и генов рРНК (*rrn*), включая участки 16S, 23S, 5S и тРНК^{Glu} (*glu*), фактора элонгации Tu (*tuf B*) рибосомных белков L11 (*rplK*), L1 (*rplA*), L7/L12 (*rplL*), β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы (*rpoB* и *rpoC*) приведено по давней работе [4]

позволяет продлить первую концевую последовательность еще на два фрагмента: D-H₁-J-F₁-K-I₁. С другой стороны, из величины продуктов частичного гидролиза P11, P12 и P13 следует, что фрагменты F₂, H₂ и I₂, парные фрагментам F₁, H₁ и I₁, образуют с фрагментом G последовательность I₂-H₂-G-F₂. Наконец, расположение фрагмента А между этими последовательностями вытекает из размера составных фрагментов P4, P3 и P1. Отсюда следует *EcoRI*-нуклеотидная карта ДНК $\lambda rif^d 47$, изображенная на рис. 4.

Для определения положения на этой карте гена *rrn*, кодирующего синтез рибосомных РНК, мы гибридизовали *EcoRI*-фрагменты ДНК $\lambda rif^d 47$ с рРНК *E. coli*. Оказалось, что при инкубации смеси фрагментов А—К с иммобилизованной на целлюлозе суммарной рРНК *E. coli* в таких условиях (70%-ный формамид, 48°), когда негибридизованные участки ДНК сохраняют двунигчатую структуру [9], из всех фрагментов только А, Н и I связываются с рРНК. С другой стороны, отдельные фрагменты А—К после двукратной очистки гель-электрофорезом гибридизовали с [¹⁴C]рРНК на нитроцеллюлозных фильтрах; было установлено, что только три фрагмента (из фракций А, G + Н и I) способны связываться с рРНК, причем фрагмент А связывается с 23S-рРНК, фрагмент I — с 16S- и 23S-рРНК, а фрагмент из фракции G + Н — только с 16S-рРНК. Отсюда следует, что ген *rrn* в ДНК $\lambda rif^d 47$ расположен в последовательности фрагментов А-I₂-H₂.

Как видно из сравнения карт, изображенных на рис. 4, различие между ДНК $\lambda rif^d 47$ и ДНК $\lambda rif^d 18$ заключается в том, что у первой из них интегрированный участок бактериальной хромосомы короче слева и длиннее

в правой части, в которой имеется два дополнительных сайта узнавания нуклеазой *endoR.EcoRI*. Вследствие этого при гидролизе ДНК λ rif^d47 образуются четыре малых фрагмента (D, F₂, G и H₂) вместо двух больших, получающихся из ДНК λ rif^d18 (фрагменты величиной 7,44 и 5,72 кнп). Обе ДНК содержат одинаковые участки собственной ДНК λ (около 19,2 кнп) между сайтом *att* и правым «липким» концом, но ДНК λ rif^d47 содержит больше собственной ДНК λ с левого конца молекулы.

Авторы выражают благодарность С. З. Миндлин (Институт молекулярной генетики АН СССР) за предоставленный штамм *E. coli*, лизогенный по фагам λ и λ rif^d47, и Ю. С. Полонскому (Институт молекулярной генетики АН СССР) за предоставленные [¹⁴C]рРНК.

Экспериментальная часть

Культура лизогенного штамма *E. coli* K12 47-3 [AB 1450 (λ CI857s7) (λ rif^d47)], описанного в работе [1], получена от С. З. Миндлин (ИМГ АН СССР, Москва).

Ферменты: панкреатическая ДНКаза (КФ 3.1.4.5; Worthington, США); панкреатическая РНКаза (КФ 2.7.7.16; PL Biochemicals, США); нуклеаза *endoR. EcoRI* (КФ 3.1.4.32) получена по методу [10], за единицу активности принято количество фермента, расщепляющее 1 пмоль фосфодиэфирной связи в ДНК λ за 1 мин при 37°; T4 ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1) выделена по методу [14]; ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7) выделена из *E. coli* В по методу [11] и действием субтилизина по методу [12] превращена в так называемую ДНК-полимеразу Кленова («большой фрагмент» ДНК-полимеразы I, лишенный 5' → 3'-нуклеолитической активности [13]).

Сорбенты: целлюлоза MN-300 (Serva, ФРГ); DEAE-целлюлоза (Whatman, Англия), агароза и биогель А (Bio-Rad, США); нитроцеллюлозные фильтры Synpor, диаметр пор 0,4 мкм, производства Chemapol (ЧССР); рРНК-целлюлозу готовили из суммарной рРНК *E. coli* и целлюлозы MN-300 по методу [15], содержание в ней связанной рРНК определяли путем обработки панкреатической РНКазой (10 мкг фермента на 1 мл суспензии РНК-целлюлозы, 2 ч при 37°) с последующим измерением D_{260} фильтрата.

Реактивы: триптон и дрожжевой экстракт (Difco, США); силиконовый пеногаситель С и EDTA (Serva, ФРГ); трис (Reanal, Венгрия), PIPES и SDS (Sigma, США); NTP, гАТФ и дитиотреит (Calbiochem, Швейцария); [α -³²P]NTP (150—250 Ки/ммоль) (Amersham, Англия). Суммарную тРНК (Sigma, США) дополнительно очищали трехкратной фенольной экстракцией из трис-хлоридного буфера (рН 7,6) и дважды переосаждали из воды спиртом, препараты [¹⁴C] рРНК (суммарная, 16S и 23S, 50 мкКи/мг) получены от Ю. С. Полонского (ИМГ АН СССР, Москва). CsCl (х.ч.) производства Союзхимреактив перед употреблением перекристаллизовывали.

Буферные растворы: А — 10 мМ трис-НCl, 0,1 М КCl, 0,1 мМ EDTA, рН 7,9; Б — аналогичен А, но с 50 мМ NaCl и 1 мМ EDTA; В — аналогичен Б, но с 0,1 М NaCl; Г — аналогичен А, но с 50 мМ KCl и без EDTA; Д — 0,9 М трис-НCl, 0,1 М MgCl₂, рН 7,4; Е — 0,2 М трис-НCl, 0,1 М MgCl₂, 0,1 М 2-меркаптоэтанол, рН 7,5; Ж — 50 мМ трис-НCl, 10 мМ EDTA, рН 7,6; З — 0,1 М трис-НCl, 1 мМ EDTA, рН 7,5; И — 40 мМ трис, 20 мМ AcONA, 25 мМ AcOH, 1 мМ EDTA, рН 8,0; К — 50 мМ трисборат, 1 мМ EDTA, рН 8,3; Л — 0,2 М глицин, 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, рН 8,0; М — 1 М PIPES, 0,3 М EDTA, рН 7,8; Н — 3,0 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия; О — 50 мМ TEAB, рН 8,0; П — 0,7 М трис-НCl, 0,1 М MgCl₂, 0,1 М дитиотреит, рН 7,6; Р — 0,5 М NH₄OAc, 0,01 М MgCl₂, 0,1 М EDTA, 0,1% SDS.

Аналитический гель-электрофорез проводили в 1% агарозном геле (столбики 6 × 120 мм в буфере И или пластины 1 × 200 мм в буфере К) при 50 В, гель прокрашивали 30 мин раствором 1 мг/л бромистого этидия

и просматривали под ультрамикроскопом УБ-1 или фотографировали (панхроматическая фотопленка 250 ед. ГОСТ, светофильтр ОС-14) в камере Birchover Instruments (Англия) при освещении лампами с излучением 254 и 366 нм. Ультрафиолетовые спектры измеряли на спектрофотометре Sprecord UV-Vis Carl Zeiss (ГДР) и микроспектрофотометрической приставке МСФП-1, производства НИОХ СО АН СССР. Измерение радиоактивности проводили на сцинтилляционном счетчике Mark II, Nuclear Chicago (США).

Получение ДНК λ rif^d47. 150 мл посевной культуры лизогена *E. coli* K12 47-3, выращенной в течение ночи при 30° до D_{550} 2—4, вносили в 15 л среды, содержащей 240 г триптона, 150 г дрожжевого экстракта, 75 г NaCl (рН 7,0) и 0,1 мл пеногасителя, и выращивали 2,5—3 ч при 32° до D_{550} 0,6—0,7. Затем в течение 15—20 мин нагревали до 42°, выдерживали 5 мин при этой температуре, после чего выращивали еще 3 ч при 37° и быстро охлаждали до 10°; все эти операции проводили при аэрации 10 л/мин через пористый стеклянный фильтр № 2). Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин (центрифуга Beckman J-21В, ротор JA-10), клетки суспендировали в 100 мл буфера А и замораживали при -70°. Замороженные клетки хранили не более 1 месяца при -20°.

Суспензию клеток оттаивали, прибавляли 10 мл хлороформа, встряхивали 10 мин при 37° и хлороформ отделяли. К образовавшейся вязкой массе прибавляли 1 мл 1 М MgCl₂ и раствор ДНКазы до конечной концентрации 10 мкг/мл. Смесь инкубировали 15 мин при 37° (до разжижения) и затем 12 ч при 4°, после чего центрифугировали 20 мин при 10 000 об/мин (центрифуга Beckman J-21В, ротор JA-20).

Полученный супернатант делили на порции по 25 мл, каждую подслаивали 3,0 мл 2,7 М и 3,0 мл 3,2 М раствора CsCl в буфере А и центрифугировали 4 ч при 22 000 об/мин (ротор Spinco SW27). Осадок фаговых частиц суспендировали в 6—8 мл буфера А, осторожно перемешивая на магнитной мешалке при 2—4° в течение 2—3 сут. Полученную суспензию делили на порции по 3—4 мл, каждую подслаивали тремя 1,2-мл порциями CsCl в буфере А (2,7; 3,8 и 5,0 М) и центрифугировали 3 ч при 24 000 об/мин (ротор Spinco SW40). Содержащую фаговые частицы фракцию из середины зоны 3,8 М CsCl (d 1,5) выделяли, отбирая фракции со дна центрифужной пробирки, и диализовали против буфера Б.

Диализованную суспензию фагов разбавляли буфером Б до D_{260} 10, прибавляли $1/20$ объема 10% раствора SDS, нагревали 5 мин при 65°, охлаждали до 0°, прибавляли $1/4$ объема 2,5 М KCl, выдерживали 15 мин при 0° и осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. Полученный раствор ДНК исчерпывающе диализовали сначала против буфера В, а затем против буфера Г и хранили при -50°. Выход смеси ДНК λ и ДНК λ rif^d47 составлял 10—20 мг.

Мечение «липких» концов фаговой ДНК. К раствору 30 мкг (1 пмоль) смеси ДНК λ и λ rif^d47 в 100 мкл воды прибавляли по 2 мкл 5 мМ растворов АТР и ТТР, по 40 мкл 4 мМ растворов [α -³²P]GTP и [α -³²P]CTP, 20 мкл буфера Е и 3 мкл (3 ед. акт.) раствора ДНК-полимеразы Кленова. Полимеразную реакцию проводили 15 мин при комнатной температуре и останавливали, прибавляя 10 мкл 0,2 М EDTA. Смесь обессоливали фильтрацией через колонку 0,7 × 15 см с биогеом А 1,5 м в буфере О, контролируя процесс с помощью приставки МСФП-1, и полученный раствор упаривали досуха.

Определение размеров и числа EcoRI-фрагментов ДНК λ rif^d47. К раствору 30 мкг (1 пмоль) смеси ДНК λ и λ rif^d47 в 100 мкл воды прибавляли 12 мкл буфера Д и 10 мкл (0,1 ед. акт.) рестриктазы EcoRI. Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 37°, затем прибавляли 5 мкл 5 мМ раствора ТТР, 40 мкл 4 мМ раствора [α -³²P]АТР и 5 мкл (5 ед. акт.) ДНК-полимеразы Кленова. Полимеразную реакцию проводили и продукты выделяли, как описано в предыдущем опыте. После упаривания обессоленного раствора остаток растворяли в 20 мкл воды, прибавляли 5 мкл

50% раствора сахарозы, содержащего 0,2% бромфенолового синего, нагревали 10 мин при 70°, охлаждали во льду и наносили на пластину (1 × 400 мм) 0,5% агарозного геля в буфере К. Электрофорез проводили при напряжении 7 В/см. Обнаруженные радиоавтографией зоны вырезали, наносили на бумагу, высушивали и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтиллаторе. Полученные данные приведены в табл. 1 и 2.

Разделение EcoRI-фрагментов ДНК λ и λ gt¹⁰47. К 5 мл раствора, содержащего 1,2 мг смеси ДНК, полученной в первом опыте, прибавляли 0,5 мл буфера Д и 50 мкл (0,5 ед. акт.) EcoRI. Смесь инкубировали 10—12 ч при 37°, после чего реакцию останавливали, прибавляя 1 мл 0,1 М EDTA, содержащего 50% сахарозы и 0,05% бромфенолового синего. Раствор наносили на 1% агарозный гель в буфере Л в шести трубках размером 1,4 × 15 см и при 20° проводили электрофорез под напряжением 60 В (20 мА на трубку) при постоянной циркуляции 1 л буфера между верхним и нижним сосудами со скоростью 400 мл/ч. По достижении красителем нижнего края геля (через 3—4 ч) столбики геля извлекали, прокрашивали 15 мин раствором 1 мг/л бромистого этидия, просматривали под ультрамикроскопом и светящиеся зоны вырезали. Для очистки вырезанные диски геля накладывали на свежеприготовленные столбики геля в трубках того же размера и подвергали повторному электрофорезу в тех же условиях. Диски геля с зонами очищенных фрагментов помещали в трубки (1,4 × 6 см), заполняли сверху 0,5% агарозой в буфере Л, нижний конец трубки помещали в диализный мешок с 2 мл того же буфера и подвергали электрофорезу до тех пор (2—3 ч при 20 мА на трубку), пока контрольное прокрашивание геля бромистым этидием не показывало, что ДНК полностью извлечена. После этого внутрь диализного мешка погружали платиновый анод и пропускали ток 10 мА в течение 1—3 мин. Полученный раствор ДНК адсорбировали на DEAE-целлюлозе DE-52 (1 мл сорбента на 50 мкг ДНК), уравновешенной буфером Ж, колонку промывали тем же буфером, затем 0,15 М NaCl в буфере Ж и, наконец, смывали ДНК минимальным объемом 1М NaCl в том же буфере. ДНК из элюата осаждали двумя объемами холодного 95% спирта и хранили при -20°. Перед использованием осадок центрифугировали, высушивали и растворяли в подходящем буфере.

Препаративное получение фрагментов EcoRI-F — EcoRI-K. К 5 мл раствора, содержащего 1,2 мг смеси ДНК, полученной в первом опыте, прибавляли 0,5 мл 3 М AcONa и 10 мл спирта, замораживали при -70° и оттаивали. Через 20 мин осадок отделяли центрифугированием (здесь и далее: 10 мин при 4000 об/мин), высушивали в вакууме, растворяли в 1,2 мл воды, прибавляли 0,2 мл буфера П, 0,6 мл 5 мМ rATP и 1 мкл раствора T4 ДНК-лигазы (10 ед. акт.). Смесь инкубировали 3 ч при 37°, прибавляли 4 мл спирта, замораживали при -70° и оттаивали. Выпавшую ДНК через 20 мин отделяли центрифугированием, высушивали в вакууме, растворяли в 5 мл воды, прибавляли 0,5 мл буфера Д и 50 мкл раствора EcoRI (0,5 ед. акт.) и инкубировали 10—12 ч при 37°. Затем реакцию останавливали и смесь подвергали электрофоретическому разделению, как описано в предыдущем опыте. Для извлечения фрагментов F—K вырезанные диски геля с зонами очищенных фрагментов (объем геля с зоной одного фрагмента 3—4 мл) замораживали при -70°, измельчали растиранием, оттаивали, прибавляли 6—8 мл буфера Р, инкубировали 3 ч при 45°, охлаждали, агарозу отфильтровывали на стеклянном фильтре № 2 и промывали 2—3 мл буфера Р. К фильтрату прибавляли 5 мкл 1% раствора tРНК, 25—30 мл изопропилового спирта, замораживали при -70° и оттаивали. Через 20 мин осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 100 мкл буфера О, фракцию ДНК отделяли от tРНК на колонке с биогеом А 1,5 м (0,7 × 15 см) в буфере О, контролируя процесс с помощью приставки МСФП-1, и полученный раствор упаривали досуха. Выход фрагментов К—F составлял 7—15 мкг.

Таблица 4

Фрагменты ДНК λ rif ^{d47}	[¹⁴ C]pРНК, гибридизовавшаяся с 10 мкг ДНК, имп/мин		
	суммарная pРНК	16S-pРНК	23S-pРНК
Сумма всех фрагментов	1500		
А	1420	310	1670
В	280		
С	250		
Д	260		
Е	270		
F	280		
G+H	2500	1820	450
I	2600	1850	1480
J	200		
K	220		

Гибридизация EcoRI-фрагментов ДНК λ rif^{d47} с pРНК E. coli. а) Гибридизация с pРНК-целлюлозой. 100 мкг суммарной смеси EcoRI-фрагментов ДНК λ и rif^{d47} в 0,50 мл раствора, полученного после ферментативного гидролиза как описано в предыдущем опыте, прибавляли к суспензии промытой формамидом pРНК-целлюлозы (содержащей 400 мкг pРНК) в 1,75 мл формамида и 0,25 мл буфера М и инкубировали 4 ч при $48 \pm 0,2^\circ$. Осадок отфильтровывали, промывали 10 мл буфера З, суспендировали в 2 мл того же буфера, прибавляли 0,1 мл раствора панкреатической РНКазы (1 мг/мл) и инкубировали 1 ч при 37° . Гидролизат отфильтровывали, осадок целлюлозы промывали 0,7 мл 4 М NaCl, объединенный фильтрат разбавляли 5,6 мл охлажденного 95% спирта, выдерживали 15 ч при -20° и осадок отделяли 15-минутным центрифугированием при 10 000 об/мин. Судя по результатам аналитического электрофореза, в этом осадке содержались фрагменты ДНК только трех размеров: А, Н и I.

б) Гибридизация на нитроцеллюлозных фильтрах. Раствор 10 мкг ДНК (суммарной смеси EcoRI-фрагментов ДНК λ и rif^{d47} или одного из фрагментов, выделенных с помощью электрофореза) в 2,7 мл воды и 1,5 мкл буфера Н денатурировали нагреванием в течение 25 мин при 100° , быстро охлаждали, прибавляли 1,2 мл буфера Н и медленно (за 20 мин) фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (выдержанные в течение 1 сут в разбавленном втрое буфере Н, диаметр фильтров 20 мм). Фильтры с адсорбированной ДНК помещали во флаконы для сцинтилляционного счетчика, высушивали 3 ч в вакууме при 80° , приливали раствор [¹⁴C]pРНК (по 1 мкг суммарной pРНК или по 0,5 мкг 16S-pРНК или 23S-pРНК) в 0,77 мл воды и 85 мкл буфера Н и инкубировали 20 ч при $67 \pm 0,2^\circ$. По окончании гибридизации к пробам прибавляли по 85 мкл 0,1% раствора РНКазы (предварительно прогретого 5 мин при 80°) и инкубировали 1 ч при 37° . Затем фильтры промывали 5×10 мл охлажденного до 2° разбавленного в 10 раз буфера Н, высушивали 2 ч в вакууме при 80° и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе. Результаты измерений приведены в табл. 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Миндлин С. З., Ильина Т. С., Горленко Ж. М., Хачикян Н. А., Ковалев Ю. П. (1976) Генетика, 12, № 12, 116—130.
2. Kirschbaum J. B., Konrad E. B. (1973) J. Bacteriol., 116, 517—526.
3. Bachmann B., Low B., Taylor A. L. (1976) Bacteriol. Rev., 40, 116—167.
4. Lindahl L., Yamamoto M., Nomura M., Kirschbaum J. B., Allet B., Rochaix J.-D. (1977) J. Mol. Biol., 109, 23—47.

5. Thomas M., Davis R. W. (1975) *J. Mol. Biol.*, **91**, 315—328.
6. Yamamoto M., Lindahl L., Nomura M. (1976) *Cell*, **7**, 179—190.
7. Allet B., Jeppesen P. G. N., Katagiri K. J., Delius H. (1973) *Nature*, **241**, 120—123.
8. Gould H., Matthews H. R. (1976) *Separation Methods for Nucleic Acids and Oligonucleotides*, p. 428, Elsevier, N. Y.
9. Thomas M., White R. L., Davis R. W. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2294—2298.
10. Tanaka T., Weisblum B. (1975) *J. Bacteriol.*, **121**, 354—362.
11. Joviu T. M., Englund P. T., Bertsch L. L. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2996—3008.
12. Klenow H., Henningsen I. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 168—175.
13. Kornberg A. (1974) *DNA Synthesis*, pp. 98—100, Freeman, San Francisco.
14. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Paae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5045—5050.
15. Smith J., Smith H., Pifko Sh. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 27—32.

Поступила в редакцию
17.X.1977

RESTRICTION ENDONUCLEASE *EcoRI* MAP OF TRANSDUCING BACTERIOPHAGE λ *rif^d47*

GUREVICH A. I., AVAKOV A. E., KISELEVA O. A.,
KOLOSOV M. N.

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

DNA of the transducing bacteriophage λ *rif^d47* was cleaved by restriction endonuclease *EcoRI* into 14 fragments designated A through K in the order of their electrophoretic mobility. The size (kb number) and the sequence of the fragments in the phage DNA were found to be as follows: 4,50(D) — 2,30(H₁) — 1,25(J) — 2,80(F₁) — 1,15(K) — 2,05(I₁) — 8,65(A) — 2,05(I₂) — 2,30(H₂) — 2,40(G) — 2,80(F₂) — 7,15(B) — 5,65(C) — 3,60(E). Among the fragments, only the A, I₂, and H₂ hybridized [specifically with *E. coli* rRNAs (with 23S, 23S + 16S, and 16S rRNA, respectively)]. In accordance with the hybridization experiments, the comparison with physical and genetic [maps of λ *rif^d18* indicated *rif^d47* DNA to contain several *E. coli* genes located at 88' of the bacterial chromosome and involved in the transcriptional and translational machinery of *E. coli*, viz. the genes coding for rRNAs (and tRNA^{Glu}), ribosomal proteins L1, L11, and L7/L12, elongation factor Tu, the β and (partially) β' subunit of RNA polymerase.