



УДК 547.962.32

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ФРАГМЕНТА ДНК
БАКТЕРИОФАГА λimm^{434} , СОДЕРЖАЩЕГО ОПЕРОН
4S-РНК (*oor*РНК)

Свердлов Е. Д., Монастырская Г. С., Ростанцов В. М.

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

Из ДНК бактериофага λimm^{434} после расщепления рестриктазой *Eco* RI выделен фрагмент с молекулярным весом $0,776 \cdot 10^6$. Фрагмент локализован между точками 78 и 80,3% физической карты ДНК фага. Разработан препаративный метод его выделения. Показано, что фрагмент содержит транскриптон 4S-*oor* РНК. При транскрипции фрагмента *in vitro* в присутствии фактора терминации ρ наблюдается заметное увеличение количества синтезированной *oor*РНК.

При транскрипции ДНК фага λimm^{434} *in vitro* РНК-полимеразой *E. coli* наиболее активная инициация происходит на четырех промоторах, один из которых, p_0 , регулирует синтез короткой 4S-РНК (*oor*РНК) [1]. В последнее время эта РНК по ряду причин привлекает к себе определенное внимание. Во-первых, ее оперон находится в области начала репликации (*ori*) ДНК λ , и приводились данные, что она участвует в инициации репликации [2, 3]. Во-вторых, существуют доводы в пользу того, что *in vivo* 4S-РНК содержится на 5'-конце значительно более длинной РНК, включающей транскрипт гена репрессора [4]. На основании этого высказывается гипотеза [4], что лизогенный путь развития фага включает в себя синтез длинной РНК от промотора p_0 в область иммунности. В связи с этим значительный интерес представляло бы выделение фрагмента ДНК λ , содержащего оперон 4S-РНК, и изучение особенностей его транскрипции. В данной работе мы описываем препаративную простую методику получения такого фрагмента.

Известно, что при расщеплении ДНК бактериофага λ рестриктазой *Eco*RI образуется 6 фрагментов (А — F, рис. 1) [5]. При этом из анализа большого числа литературных данных можно с достаточной уверенностью полагать, что оперон 4S-РНК находится во фрагменте D. Эти данные суммированы на рис. 1. В работе Аллета [6] картированы места расщепления ДНК λ вблизи области иммунности различными рестриктазами. Показано, что *Eco*RI-фрагмент D практически полностью содержит в своей правой части, расположенной вне области иммунности, последовательность *Hae*III-фрагмента 1190 и оба эти фрагмента содержат участки расщепления рестриктазами *Hind*II и *Hpa*II, отмеченные на рис. 1. *Hae*III-фрагмент 1190 имеет только по одному участку расщепления для каждого из этих ферментов. В работе Пташине [7], с другой стороны, установлена последовательность части *Hae*III-фрагмента 1190. Показано, что здесь содер-

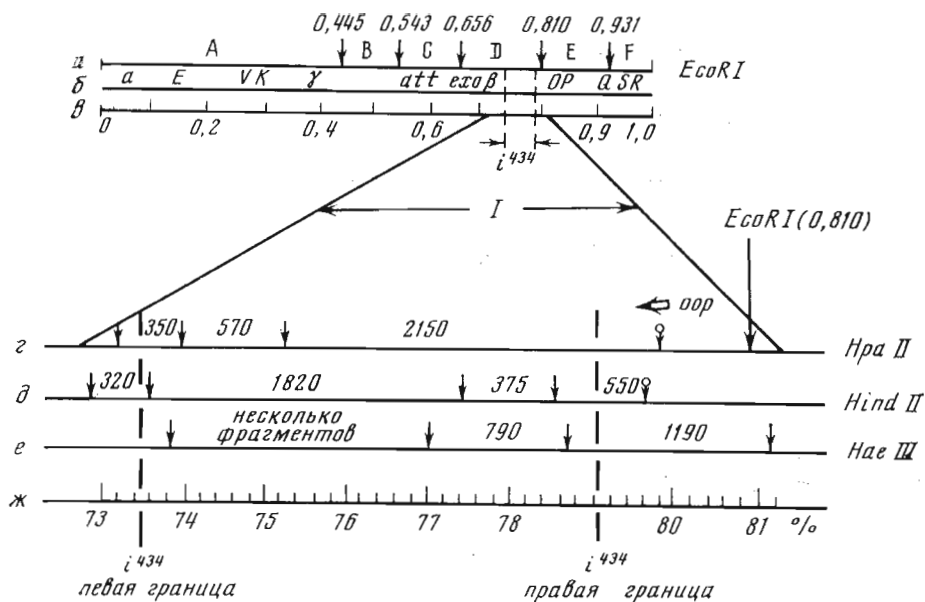


Рис. 1

Рис. 1. Локализация гена *oop*РНК на физической карте ДНК фага λ: *a* — карта расщепления ДНК фага λ рестриктазой *EcoRI* [5]; *b* — расположение генов на ДНК фага λ [5]; *c* — масштаб (*a*) и (*b*) в долях полной длины ДНК фага λ; *z* — карта расщепления участка I вблизи области иммунности (*i⁴³⁴*) рестриктазой *HpaI* [6]; *д*, *e* — карты расщепления этого участка рестриктазами *HindII* и *HaeIII* [6]; *ж* — масштаб (*z*) — (*e*) в единицах длины ДНК λ. Пунктирными вертикальными линиями обозначены границы области иммунности фага 434 в ДНК λ *imm⁴³⁴*. Вертикальными стрелками указаны места расщепления рестриктазами

Рис. 2. Гель-электрофорез в 1,2% агарозе *EcoRI*-гидролизатов ДНК λ (1), ДНК λ *imm⁴³⁴* (2) и плазмиды *pS3* (3)

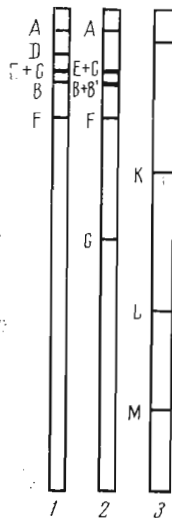


Рис. 2

жится 3'-концевая последовательность гена *oop*РНК, внутри которой находятся участки расщепления рестриктазами *HpaII* и *HindII*.

Учитывая локализацию этих участков на ДНК λ (рис. 1) и длину *oop*РНК (около 80 нуклеотидов [8, 9]), можно заключить, что весь оперон *oop*РНК находится внутри *EcoRI*-фрагмента D.

Этот вывод согласуется с работами Шибальского [2, 4, 10], по данным которого ген *oop*РНК на карте λ локализован в участке 80—81%. Наконец, показано, что 4S-РНК гибридизуется с *l*-цепью *EcoRI*-фрагмента D [11]. *EcoRI*-фрагмент D включает в себя также область иммунности и поэтому кроме промотора *p_o* содержит промоторы *p_R* и *p_L*. Кроме того, его значительная длина (~7900 пар оснований) сама по себе может служить источником неопределенности при изучении транскрипции, поскольку создает значительную вероятность для неспецифической инициации. В то же время из ряда работ следует, что ДНК родственного фага λ *imm⁴³⁴*, отличаю-

Определение молекулярного веса фрагмента G исходя из его радиоактивности

Фрагмент	$M \cdot 10^{-6}$ *	Радиоактивность A **, имп/мин	$K = A/M$	Вычислено $M \cdot 10^{-6}$
A	13,7	13450±730	981,8	—
B+B'	3,02 и 3,02	6230±360	2062:2=1030	—
C+E	3,48 и 3,73	8593±741	2380:2=1190	—
F	2,13	2120±180	995,3	—
G	—	815±15	1050 ***	0,776

* По данным работы [5].

** Средняя из трех определений.

*** Среднее значение K для фрагментов A—F.

Таблица 2

Анализ частоты последовательностей NpG для различных N в 4S-РНК, синтезированной РНК-полимеразой *E. coli* на фрагменте G в качестве матрицы

Нуклеозид-3'-фосфат (N)	Радиоактивность, имп/мин	Доля от суммарной радиоактивности	Доля NpG по данным работы [9]
A	244	0,236	0,222
G	222	0,215	0,222
U+C	567	0,548	0,556

щаяся от ДНК λ только заменой области иммунности, содержит в этой области дополнительный участок расщепления *EcoRI* (см., например, [12]). В результате этого в смеси фрагментов, получающихся при расщеплении ДНК λimm^{434} рестриктазой *EcoRI*, отсутствует фрагмент D, образующийся при расщеплении ДНК λ , но наблюдаются два других фрагмента, один из которых (B') совпадает по электрофоретической подвижности с фрагментом B, а другой (обозначаемый далее G) имеет значительно более высокую по сравнению с остальными подвижность и, следовательно, значительно меньший молекулярный вес [12].

Мы проверили эти данные и получили результаты, приведенные на рис. 2. Действительно, в случае ДНК λimm^{434} образуется короткий фрагмент G, обладающий высокой электрофоретической подвижностью. Из простых соображений мы пришли к выводу, что этот маленький фрагмент содержит последовательности правой части фрагмента D и, следовательно, оперон *oor*РНК. Действительно, расстояние от левого конца фрагмента D до левого края области иммунности больше длины фрагмента F и составляет 8,9% длины ДНК λ . Следовательно, даже если бы расщепление ДНК λimm^{434} внутри области иммунности происходило в непосредственной близости от ее левой границы, длина фрагмента, соответствующего левой части фрагмента D, была бы больше длины фрагмента F.

Мы предприняли более детальное изучение фрагмента G. Во-первых, поскольку точка расщепления *EcoRI* ДНК λimm^{434} внутри области иммунности не была точно локализована на физической карте, следовало определить молекулярный вес этого фрагмента. Для этого были использованы два метода. В одном из них ДНК λimm^{434} , равномерно меченую ^{32}P , расщепляли рестриктазой *EcoRI* и после разделения продуктов в агарозном геле определяли радиоактивности участков геля, соответствующих каждому фрагменту. Полученные данные приведены в табл. 1. Отношение радиоактивностей (A) продуктов равно отношению их молекулярных весов.

Молекулярные веса (M) фрагментов A—F известны, поэтому из них легко вычислить коэффициент пропорциональности $K = A/M$ и из

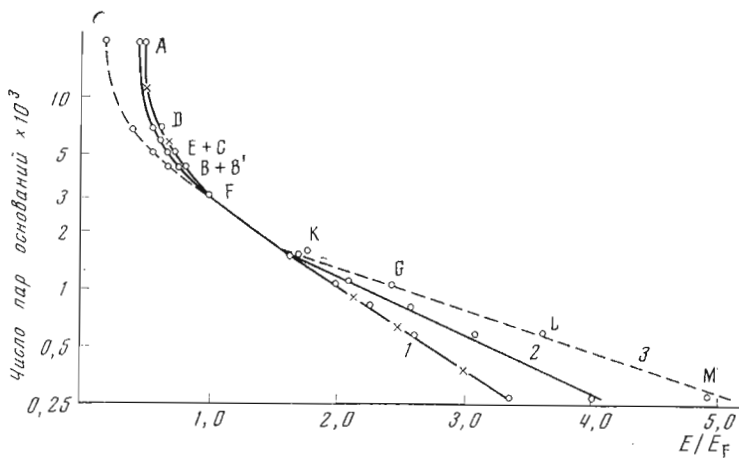


Рис. 3. Зависимость электрофоретической подвижности фрагментов *EcoRI*-гидролизата ДНК λ , ДНК *limm*⁴³⁴ и плазмиды pSc3 от числа пар оснований при фореze в агарозном геле различной концентрации. Подвижность фрагмента F принята за единицу. (Число пар оснований во фрагментах *EcoRI* гидролизата pSc3: K — 1600, L — 600, M — 275 [13].) 1 — 1,2% агарозный гель; 2 — 1,5%; 3 — 2,0%

определенной радиоактивности исследуемого фрагмента G найти его молекулярный вес, который оказывается равным $0,776 \cdot 10^6$.

Из данных табл. 1 видно, что радиоактивность полосы, соответствующей фрагменту B, в 2 раза выше, чем ожидается из его молекулярного веса. Следовательно, в полосе находятся два фрагмента одинаковой длины (B и B'), что соответствует данным работы [12] по длине фрагмента ДНК *limm*⁴³⁴, образующегося в результате расщепления области иммунитета. Таким образом, длина второго фрагмента, B', содержащего участок области иммунитета ДНК *limm*⁴³⁴, соответствует молекулярному весу $3,03 \cdot 10^6$. Сумма молекулярных весов обоих фрагментов, B' и G, составляет $3,8 \cdot 10^6$ и отличается от молекулярного веса фрагмента D ($4,7 \cdot 10^6$) из ДНК фага λ . Возможно, области иммунитета этих фагов имеют различную длину. В соответствии с нашими данными точка расщепления внутри области иммунитета *limm*⁴³⁴ находится на расстоянии 78% длины ДНК *limm*⁴³⁴ от ее левого конца. Полученные таким образом данные подтверждают независимым определением молекулярного веса фрагмента G*, основанным на сравнении его электрофоретической подвижности с подвижностью известных фрагментов ДНК, получающихся при расщеплении плазмиды pSc3 [13]; результаты приведены на рис. 2 и 3. Найденный вторым способом молекулярный вес ($0,757 \cdot 10^6$ дальтон, 2,45% длины ДНК λ) почти совпадает с определенным по первому методу.

Для препаративного выделения фрагмента G было использовано ультрацентрифугирование в градиенте концентрации сахарозы. Нанлучшее разделение при центрифугировании в роторе SW-41 наблюдалось в 15 \rightarrow 30%-ном градиенте сахарозы при 4° за 18 ч при 36 000 об/мин (до 0,15 мг смеси продуктов расщепления *limm*⁴³⁴ в одной пробирке). Выделенный таким образом фрагмент был исследован в качестве матрицы для синтеза РНК РНК-полимеразой *E. coli*. Получаемые в результате его транскрипции в присутствии [α -³²P]рибонуклеозидтрифосфатов продукты разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле и после радиоавтографии сопоставляли их с продуктами, получающимися при синтезе на целой ДНК фага λ . Из приведенных на рис. 4 данных видно, что в отличие от целой ДНК λ фрагмент G программирует синтез значительно меньшего числа

* Это определение было проведено в нашей лаборатории Н. А. Петровым.

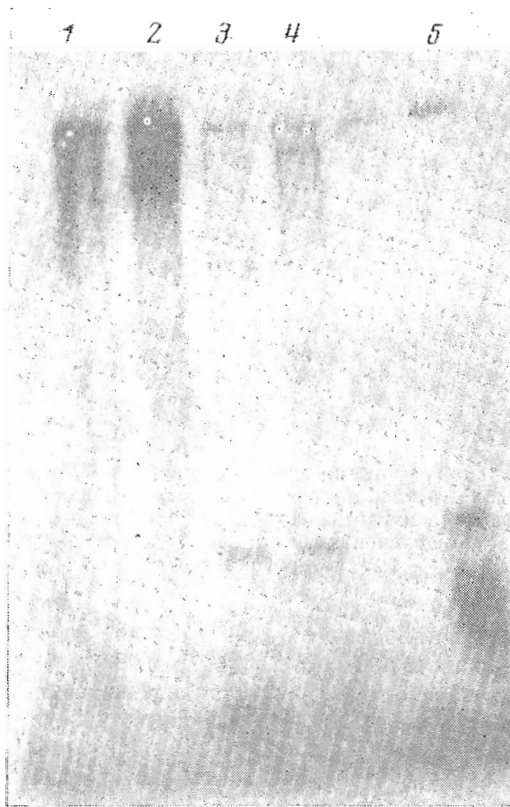


Рис. 4. Радиоавтография меченых ^{32}P транскриптов ДНК фага λ и фрагмента G. 1 — ДНК фага λ + ρ -фактор, 2 — ДНК фага λ , 3 — фрагмент G + ρ -фактор, 4 — фрагмент G, 5 — ^{32}P -тРНК

продуктов. Основной из них соответствует по подвижности тРНК, использованной в качестве свидетеля, и, очевидно, представляет собой 4S-оорРНК.

Для дополнительного подтверждения этого вывода был проведен анализ ближайших соседей гуаниновых звеньев этой РНК. С этой целью РНК, синтезированную в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, после электрофореза элюировали из геля, гидролизовали щелочью и полученные 3'-мононуклеотиды разделяли, как описано в «Экспериментальной части». Определение относительной радиоактивности каждого из них дает долю данного нуклеотида в последовательностях NpG. Полученные результаты приведены в табл. 2, где они сопоставлены с результатами, рассчитанными из известной последовательности оорРНК [9] *. (Из-за недостаточного разделения пиримидиновых нуклеотидов в нашей системе мы приводим сумму пиримидиновых 5'-соседей.) Видно, что наблюдается хорошее совпадение экспериментальных и рассчитанных данных.

Обращает на себя внимание значительное увеличение количества 4S-РНК, когда транскрипция проводится в присутствии фактора терминации транскрипции ρ . Такой эффект наблюдали недавно Розенберг и др. [14, 15] при транскрипции ДНК фага *λgal*, хотя обычно считается, что терминация оорРНК не зависит от ρ . Этот результат, очевидно, служит еще одним подтверждением того, что фрагмент G действительно программирует синтез оорРНК.

* Полная последовательность оорРНК была впервые определена Дальбергом и соавт. [8]. Однако в последующих работах [7, 9] их данные были уточнены.

Экспериментальная часть

Фаги λ и λ imm⁴³⁴ получали после тепловой индукции лизогенных бактерий, как описано нами ранее [16]. Для получения фагов, равномерно меченных ³³P, бактерии выращивали на среде, содержащей [³³P]фосфат натрия. Рестриктазу *EcoRI* (КФ 3.1.4.32) выделяли по методу [17], опуская хроматографию на DEAE-целлюлозе. Фермент не содержал других эндонуклеаз.

РНК-полимеразу *E. coli* выделяли по методу [18]. Полученный фермент имел чистоту не менее 95% и не содержал нуклеазных или АТР-азной активностей. Незначительную полинуклеотидфосфорилазную активность ингибировали добавлением в реакционную смесь 0,4 мМ фосфата калия. Фермент содержал до 90% σ -субъединицы по данным денситометрии электрофореграмм, окрашенных кумасси R-250. 60% фермента содержало функционально-активную σ -субъединицу по тесту [19]. Удельная активность фермента по тесту [18] соответствовала 500 ед. акт./мг при определении на ДНК тимуса теленка и 3000 ед. акт./мг при определении на ДНК фага T7.

Получение ДНК из фагов и их расщепление рестриктазой *EcoRI* проводили как описано ранее [16]. Плазмида pSc3 предоставлена К. Г. Скрябиным (Институт молекулярной биологии АН СССР). ρ -Фактор получен по методу [20] и для первых экспериментов предоставлен нам М. Ф. Шемякиным (Институт биоорганической химии АН СССР), а для последующих — Ю. Н. Зографом (Институт молекулярной генетики АН СССР). Меченная ³²P тРНК предоставлена В. Д. Аксельродом (Институт молекулярной биологии АН СССР). Для электрофореза в гелях использовали агарозу (Bio-Rad, США), акриламид (Merck, ФРГ) и N,N'-метиленбисакриламид (Reanal, Венгрия). Нуклеозидтрифосфаты производства Reanal (Венгрия) дополнительно очищали хроматографически. [α -³²P]GTP с удельной радиоактивностью 250 Ки/ммоль — препарат фирмы Amersham (Англия).

Радиоавтографию проводили, используя рентгеновскую пленку РТ-1 Казанского химзавода им. В. В. Куйбышева. Остальные реактивы, использованные в работе, имели квалификацию х. ч. и дополнительной очистке не подвергались.

Электрофорез в 0,7 или 1,2% агарозе, окраску и фотографирование гелей проводили как описано ранее [16]. Электрофорез в 6% полиакриламиде проводили по методу [15].

Для определения молекулярного веса фрагмента по радиоактивности меченую ³³P ДНК фага λ imm⁴³⁴ расщепляли рестриктазой *EcoRI* и продукты разделяли в 1,2% агарозе. После окрашивания бромистым этидием флуоресцирующие полосы вырезали, измельчали на фильтрах GF/C (диаметр 24 мм), высушивали и просчитывали в толуольной сцинтилляционной жидкости.

Для ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы в пробирку ротора SW-41 помещали 12,6 мл градиента сахарозы и 0,3 мл раствора, содержащего 0,15 мг продуктов рестриктазного гидролизата ДНК.

Для транскрипции реакционная смесь (0,1 мл) содержала 0,04 М трис-HCl (рН 7,9), 0,06 М KCl, 0,01 М ацетат магния, 0,1 мМ дитиотрепт, 0,002 М EDTA, 0,4 мМ фосфат калия, 100 мкг/мл альбумина, по 0,1 мМ каждого рибонуклеозидтрифосфата, 2 мКи [α -³²P]GTP, 0,75 мкг ρ -фактора, 1,5 мкг РНК-полимеразы, 4 мкг ДНК или 0,4 мкг фрагмента G. Транскрипцию проводили в течение 20 мин при 37°, добавляли ДНКазу, тРНК, переосяждали спиртом и разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле.

Авторы благодарят М. Ф. Шемякина и Ю. Н. Зографа за предоставление ρ -фактора, К. Г. Скрябина за плазмиду pSc3 и В. Д. Аксельрода за меченую тРНК.

1. Blattner F. R., Dahlberg J. E. (1972) *Nature New Biol.*, **237**, 227—232.
2. Hayes S., Szybalski W. (1973) *Mol. and Gen. Genet.*, **126**, 275—290.
3. Hayes S., Szybalski W. (1975) in *DNA Synthesis and Its Regulation* (Goulian M., Hanawalt P., Fox C. F., eds.), pp. 486—512, Benjamin W. A., Inc. California.
4. Honigman A., Hu S.-L., Chase R., Szybalski W. (1976) *Nature*, **262**, 112—116.
5. Thomas M., Davis R. W. (1975) *J. Mol. Biol.*, **91**, 315—328.
6. Allet B., Solem R. (1974) *J. Mol. Biol.*, **85**, 475—484.
7. Kleid D., Humayun Z., Jeffrey A., Ptashne M. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **23**, 293—297.
8. Dahlberg J. E., Blattner F. R. (1973) in *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 533—543, Acad. Press, N. Y.—London.
9. Scherer G., Hobom G., Kössel H. (1977) *Nature*, **265**, 117—121.
10. Blattner F. R., Fiandt M., Hass K. K., Twose P. A., Szybalski W. (1974) *Virology*, **62**, 458—471.
11. Smith G. R., Hedgpeth J. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4818—4821.
12. Allet B., Jeppesen P. G. N., Katogiri K. J., Delius H. (1973) *Nature*, **241**, 120—123.
13. Maxam A. M., Tizard R., Skryabin K. G., Gilbert W. (1977) *Nature*, **267**, 643—645.
14. Rosenberg M., Weissman S., De Crombrugge B. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4755—4764.
15. Howard B. H., De Crombrugge B., Rosenberg M. (1977) *Nucl. Acid Res.*, **4**, 827—842.
16. Свeрдлов Е. Д., Монастырская Г. С., Будовский Э. И., Петров Н. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 215—221.
17. Greene P. J., Betlach M., Goodman H. M., Boyer H. W. (1974) in *Methods in Molecular Biology — DNA replication* (Wiekner R. B., ed.), vol. 7, pp. 87—105, Marcel Dekker, Inc. N. Y.
18. Burgess R. R., Jendrisak J. J. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4634—4638.
19. Mangel W., Chamberlin M. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2995—3013.
20. Darlix J. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **51**, 369—376.

Поступила в редакцию
23.XII.1977

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGE λimm^{434} DNA FRAGMENT CONTAINING THE 4S-RNA OPERON (*oopRNA*)

SVERDLOV E. D., MONASTYRSKAYA G. S., ROSTAPSHOV V. M.

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

The fragment of 0,776 · 10⁶ molecular weight has been isolated from DNA of bacteriophage λimm^{434} after cleavage with restriction *EcoRI*. The fragment is localized between the points 78 and 80,3% of the physical map of phage DNA. A preparative method for its isolation is developed. The fragment is shown to contain the operon 4S-*oopRNA*. On transcription of the fragment in vitro in the presence of termination β -factor, a considerable increase in the amount of synthesized *oopRNA* is observed.