



УДК 547.963.32.02:577.155.2

ДНК КИНЕТОПЛАСТА *CRITHIDIA ONCOPELTI*.
РЕСТРИКЦИОННОЕ КАРТИРОВАНИЕ МАКСИКОЛЬЦЕВОЙ ДНКМаслов Д. А., Эittelis Н. С., Колесников А. А.,
Зайцева Г. Н.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Кинетопластная ДНК (кпДНК) *Crithidia oncopelti* — ассоциат, состоящий из мини- и максикольцевых молекул. Миникольцевые молекулы ДНК (основной компонент ассоциата) представлены гетерогенной популяцией, состоящей из нескольких классов молекул с величинами от 1,1 до 2,6 тыс. пар оснований (тыс. п. о.). В результате анализа с помощью эндонуклеаз рестрикции была выявлена гетерогенность в первичной структуре миникольцевых ДНК.

Показано, что максикольцевые молекулы ДНК гомогенны и содержат около 24,5 тыс. п. о. На основании данных по анализу целого ассоциата кпДНК и гибридной плазмиды рСо52, содержащей встроенный максикольцевой BamHI-фрагмент кпДНК (12 тыс. п. о.), с использованием эндонуклеаз рестрикции SalI, BamHI, HindIII, EcoRI, BspI и MspI составлена рестрикционная карта максикольцевой молекулы кпДНК *C. oncopelti*.

Кинетопластная ДНК (кпДНК) трипаносомид организована в виде сложного ассоциата, в состав которого входят два типа кольцевых молекул ДНК: так называемые миникольцевые, составляющие основную массу кпДНК (около 10^4 молекул), и максикольцевые, содержащиеся в количестве 20–50 молекул на один ассоциат [1]. Предполагается, что оба типа кольцевых молекул удерживаются в составе ассоциата благодаря образованию катенанов. Размер молекул обоих типов является видоспецифичным. Величина миникольцевых ДНК варьирует от 1 тыс. пар оснований (тыс. п. о.) у трипаносом до 3 тыс. п. о. у критидий. Величина максикольцевых ДНК составляет от 20 до 38 тыс. п. о. соответственно. Максикольца трипаносомид являются аналогом митохондриального генома других эукариот [2–4]. Роль миникольцевых ДНК до настоящего времени неясна.

В последние годы ведутся интенсивные исследования первичной структуры отдельных компонентов кпДНК, выделение которых стало возможным лишь с использованием ряда методов геной инженерии [2, 5, 6]. Это позволяет приступить к построению генетических карт митохондриального генома трипаносомид, к решению вопросов об эволюции кпДНК и на этой основе к установлению филогенетических связей внутри семейства Trypanosomatidae. Однако основное внимание уделяется узкой группе так называемых «высших» трипаносомид, паразитирующих в крови теплокровных животных. Тем не менее выявление общих закономерностей в строении и функционировании кпДНК предполагает сравнительное изучение видов, представляющих разные группы этого семейства. В настоящей работе ставилась задача определить размер и построить рестрикционную карту максикольцевой молекулы кпДНК представителя «низших» трипаносомид *Crithidia oncopelti*.

Электронно-микроскопическая характеристика
кпДНК *C. oncopelti*

Как и у других трипаносомид [7–9], растянутый в белковом монослое ассоциат кпДНК *C. oncopelti* (рис. 1а) имеет вид сложной сети («network»), состоящей из переплетенных кольцевых молекул. Следует отметить, что внешний вид и основные структурные элементы этой сети



Рис. 1. Электронные микрофотографии кДНК *S. olivoreticula* – паливый ассоциат кДНК. Стрелками отмечены петли максимумцевых молекул ДНК. Увеличение 11 000 раз. б – свободные миникольцевые молекулы ДНК с различной коптурной длиной, освобождасющиеся при расщеплении ассоциата кДНК эндонуклеазой рестрикции *Sa1*. Увеличение 45 000 раз

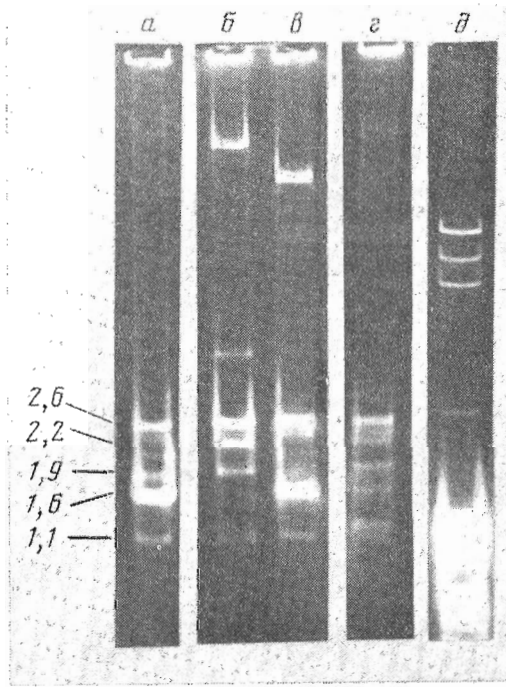


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в 0,7% агарозном геле продуктов расщепления кпДНК эндонуклеазами рестрикции: а — *Sma*I, б — *Eco*RI, в — *Bam*HI, г — *Xho*I, д — *Msp*I. Слева указаны величины основных классов миникольцевых ДНК в тыс. пар оснований

типичны для всей группы трипаносомид. Основным компонентом ассоциата кпДНК являются миникольцевые молекулы ДНК, которые располагаются по периферии ассоциата в виде многочисленных коротких петель. На электронных микрофотографиях препаратов кпДНК, частично разрушенных механически или обработанных эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI или *Sal*I (рис. 1б), наряду с линейными молекулами в заметных количествах обнаруживаются свободные миникольцевые молекулы ДНК. Большинство наблюдаемых миникольцев находится в релаксированной форме. По контурной длине миникольца могут быть подразделены на 5–7 дискретных классов с размерами от 0,4 до 0,8 мкм. В настоящее время нами исследуется характер распределения миникольцев по размеру.

Второй компонент ассоциата кпДНК трипаносомид — большие кольцевые молекулы ДНК, длина которых на порядок превышает длину миникольцевых ДНК. Как правило, они обнаруживаются в виде нескольких длинных петель, наблюдаемых по краю ассоциата [1, 9], и лишь изредка — в свободном виде [10]. На электронной микрофотографии ассоциата кпДНК *S. oncopelti* (рис. 1а) стрелками отмечены длинные краевые петли. В результате обработки кпДНК эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI или *Sal*I длинные периферические петли исчезают. При электрофорезе в агарозном геле *Eco*RI- или *Sal*I-гидролизатов кпДНК наблюдается появление зон, характерных для фрагментов максикольцевой ДНК и отличающихся от зон миникольцевых ДНК. Таким образом, наблюдаемые длинные краевые петли, по-видимому, образованы максикольцами, находящимися в составе ассоциата. Однако нельзя исключить, что часть наблюдаемых нами больших петель в действительности образована олигомерами миникольцев.

Величины рестрикционных фрагментов максикольцевых молекул ДНК
кинетопласта *C. oncopelti*

Эндонуклеаза рестрикции	Величины фрагментов, тыс. п. о.	Сумма величин фрагментов, тыс. п. о.
<i>SalI</i>	24,5	24,5
<i>EcoRI</i>	19,4; 3,3; 4×0,45 *	24,5
<i>BamHI</i>	12,5; 12,0	24,5
<i>HindIII</i>	10,0; 10,0; 4,7; 0,18 *	24,9
<i>MspI</i>	8,3; 6,7; 6,0; 2,6; 0,28 *; 0,17 *	24,1
<i>BspI</i>	7,5; 5,8; 4,8; 3,4; 0,6 *; 5×0,45 *	24,4
<i>BamHI+EcoRI</i>	12,5; 4,2; 3,3; 2,2 *; 4×0,45 *	24,0
<i>BamHI+HindIII</i>	10,0; 8,8; 3,9; 1,2 *; 0,95 *; 0,18 *	25,1
<i>BamHI+MspI</i>	6,7; 6,0; 4,7; 3,4; 2,6; 0,28 *; 0,17 *	23,9
<i>BamHI+BspI</i>	5,7; 5,5; 4,9; 3,5; 2,0; 0,6 *; 5×0,45 *; 0,28 *	24,5
<i>SalI+EcoRI</i>	12,2; 7,5; 3,3; 4×0,45 *	24,8
<i>SalI+BspI</i>	7,5; 5,6; 3,6; 3,4; 1,0 **; 0,6 *; 5×0,45 *	24,0
<i>SalI+BamHI</i>	12,0; 6,9; 5,6	24,5
<i>SalI+HindIII</i>	10,0; 7,6; 4,8; 2,0 **; 0,18 *	24,6
<i>SalI+MspI</i>	8,3; 6,7; 6,0; 2,4; 0,5 **; 0,28 *; 0,17 *	24,1
<i>HindIII+EcoRI</i>	10,0; 4,6; 3,4; 3,2; 1,3 *; 4×0,45 *; 0,18 *	24,5
<i>HindIII+MspI</i>	6,0; 6,0; 4,2; 3,7; 2,2; 0,8 *; 0,4 **; 0,28 *; 0,18; 0,17 *	24,0
<i>HindIII+BspI</i>	5,6; 4,4; 2,9; 2,6; 2,4; 2,4; 0,8 *; 0,6 *; 5×0,45 *; 0,18 *	23,9
<i>EcoRI+BspI</i>	5,6; 4,7; 4,3; 3,4; 3,1; 0,6 *; 5×0,32 *; 5×0,13 *	24,0

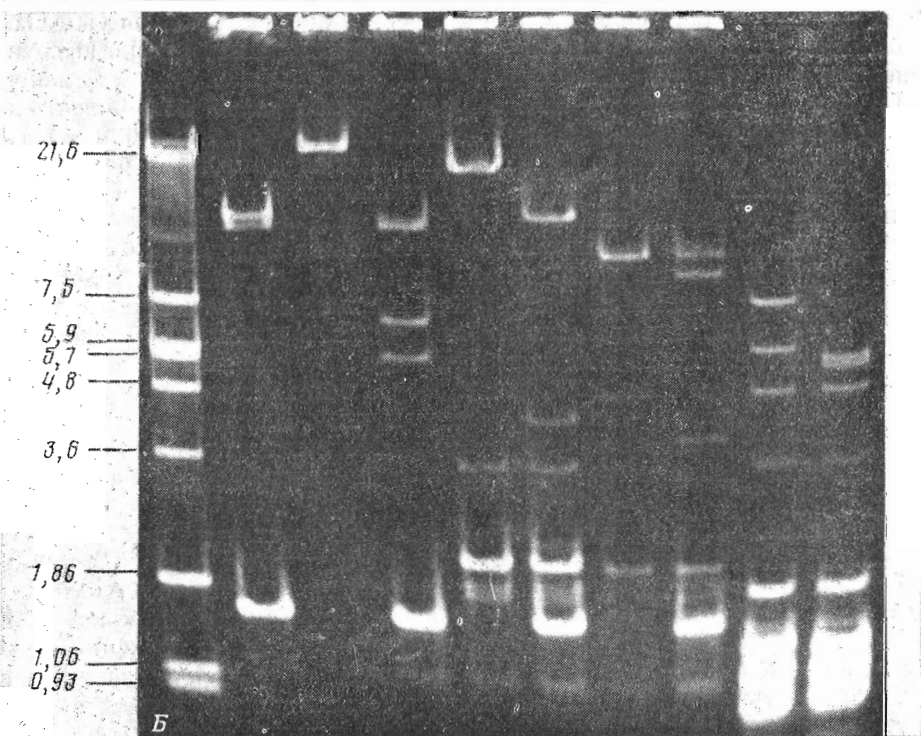
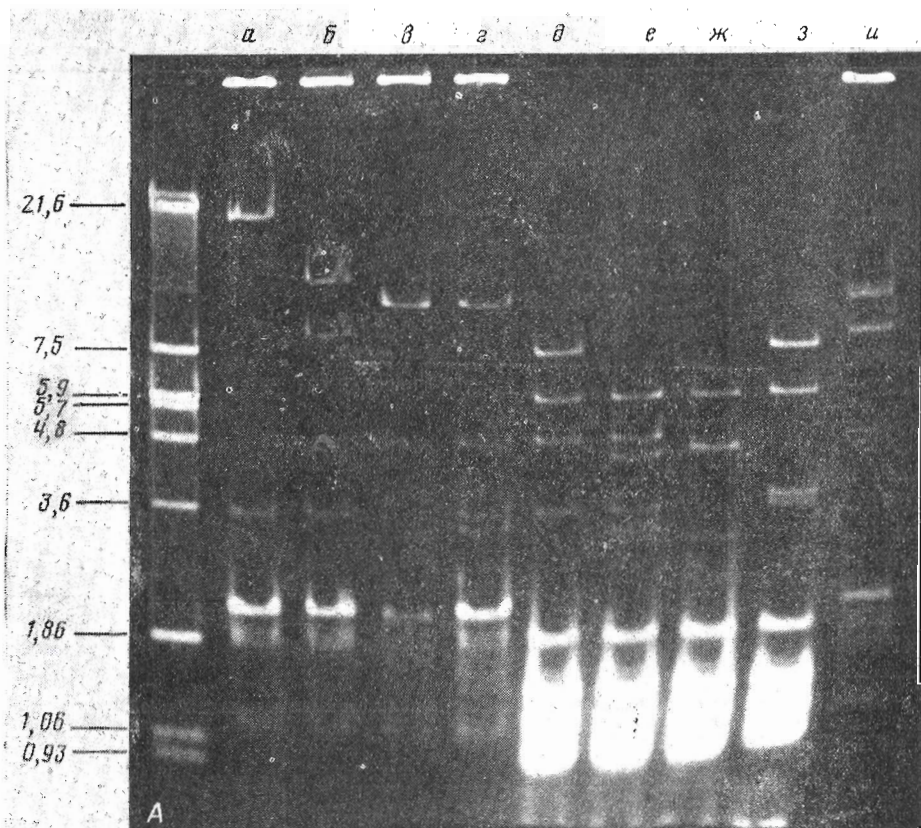
* Величины фрагментов были определены с использованием плазмиды pC052.

** Величины предполагаемых мелких фрагментов, расположенных в неклонированной части максикольцевой молекулы.

Анализ кпДНК *Crithidia oncopelti* с помощью
эндонуклеаз рестрикции

В результате расщепления кпДНК рестрикционными эндонуклеазами и электрофоретического разделения продуктов гидролиза можно выделить основные структурные компоненты ассоциата. Миникольцевые молекулы ДНК при электрофорезе в геле образуют серию полос, подвижность которых соответствует молекулам с величиной 2,6; 2,2; 1,9; 1,6 и 1,1 тыс. п.о. (рис. 2). Специфика расщепления ассоциата кпДНК различными эндонуклеазами (кроме *BspI* и *MspI*) сказывается в основном на общем количестве удаленных миниколец и на соотношении интенсивностей отдельных зон. На электронных микрофотографиях продуктов расщепления кпДНК рестриктазами *EcoRI* и *SalI* наряду с линейными молекулами обнаруживаются свободные замкнутые миникольца с такими же размерами, что и у линейных молекул. Мы предполагаем, что наблюдаемая в гелях множественность миникольцевых зон обусловлена не фрагментацией этих молекул рестриктазами, а скорее всего высвобождением миниколец, относящихся к различным классам длин. Линеаризованные миникольца освобождаются в результате разрыва, вносимого в молекулу эндонуклеазой, а замкнутые — вследствие расщепления удерживающих их молекул.

Значительная часть кпДНК оказывается нерасщепленной, за исключением тех случаев, когда используются рестриктазы *BspI* и *MspI*. Эта часть кпДНК представляет собой частично разрушенный ассоциат, который из-за своих размеров не может войти в гель и имеет вид интенсивной зоны на старте. Ни увеличение времени инкубации, ни введение дополнительных количеств ферментов не приводят к полному расщеплению кпДНК рестриктазами, узнающими и расщепляющими гексануклеотидные последовательности. Неспособность большинства рестриктаз расщеплять все входящие в ассоциат молекулы ДНК, отмеченная для большинства трипаносомид [1], свидетельствует о значительной гетерогенности первичной структуры миникольцевых ДНК. Однако обработка кпДНК



C. oncopelti рестриктазами *BspI* и *MspI* приводит к полному расщеплению этой ДНК. В этом случае вследствие гетерогенности миникольцевых молекул образующийся набор фрагментов оказывается слишком сложным для интерпретации. Поиск закономерностей в структуре миникольцевых ДНК требует изучения отдельных классов этих молекул.

Гетерогенность миникольцевых молекул по длине и первичной структуре наблюдалась также и при анализе отдельных клонов *C. oncopelti*.

При электрофорезе в агарозном геле продуктов расщепления кпДНК эндонуклеазами рестрикции *EcoRI*, *SalI*, *BamHI*, *BspI*, *MspI* и *HindIII* помимо полос, образованных миникольцевыми ДНК, наблюдаются зоны с меньшей подвижностью, содержащие фрагменты максикольцевых молекул (рис. 3А, В). Набор этих зон характерен для каждой из рестриктаз, причем расщепление всех максикольцевых ДНК и эквимоларность образующихся фрагментов свидетельствуют о гомогенности этих молекул. Данные о величине рестрикционных фрагментов максикольцевых ДНК представлены в таблице. В среднем сумма величин фрагментов максикольцевых молекул составляет около 24,5 тыс. п.о. Это позволяет предположить, что величина исходной молекулы приблизительно равна этому значению. Рестриктазы *KpnI*, *SmaI*, *PstI* и *XhoI* не расщепляют максикольцевые ДНК *C. oncopelti*.

Из данных таблицы и рис. 3В следует, что максикольцевые молекулы содержат один сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции *SalI* (рис. 3В, б), два — для *BamHI* (рис. 3В, а), три — для *HindIII* (рис. 3В, е) (наличие четвертого сайта расщепления *HindIII* было выявлено при анализе плазмиды рСо52 — см. ниже). Эндонуклеаза *EcoRI* (рис. 3В, г) расщепляет максикольцевую ДНК на два крупных фрагмента (19,4 и 3,3 тыс. п.о.), сумма которых меньше величины исходной молекулы. Следовательно, эта ДНК имеет не менее трех *EcoRI*-сайтов. Взаимная локализация *SalI*-, *BamHI*-, *HindIII*- и некоторых *EcoRI*-сайтов обеспечивает основу для дальнейшего построения более подробной рестрикционной карты.

Единственный *SalI*-сайт на максикольцевой ДНК расположен внутри *BamHI*-фрагмента (12,5 тыс. п.о.), разделяя его на субфрагменты величиной 6,9 и 5,6 тыс. п.о. (рис. 3В, а-в). Рассматриваемый *BamHI*-фрагмент находится внутри *EcoRI*-фрагмента размером 19,4 тыс. п.о. (рис. 3В, а, г, д). Это означает, что концы последнего находятся во втором *BamHI*-фрагменте величиной 12,0 тыс. п.о. Один из двух концевых *EcoRI*-*BamHI*-фрагментов (4,2 тыс. п.о.) виден на рис. 3В, д. Второй фрагмент (2,2 тыс. п.о.) не идентифицируется, поскольку расположен в зоне миникольцевых молекул. *EcoRI*-*BamHI*-фрагмент (4,2 тыс. п.о.) должен примыкать к одному из двух *BamHI*-*SalI*-фрагментов: либо к фрагменту величиной 6,9 тыс. п.о., либо к фрагменту величиной 5,6 тыс. п.о. При расщеплении *EcoRI*-фрагмента (19,4 тыс. п.о.) рестриктазой *SalI* образуются субфрагменты величиной 12,2 и 7,5 тыс. п.о. (рис. 3А, а, б). Ясно, что такому условию удовлетворяет лишь пограничное расположение фрагментов размером 4,2 и 6,9 тыс. п.о., а также фрагментов величиной 2,2 и 5,6 тыс. п.о. Отсутствие точного совпадения величины большого фрагмента (например, *EcoRI*-фрагмента размером 19,4 тыс. п.о.) с суммой величин, составляющих его субфрагментов (*EcoRI*-*SalI*-фрагментов размером 12,2 и 7,5 тыс. п.о.), объясняется значительной погрешностью определения величины фрагмента такого порядка с помощью электрофореза в агарозном геле.

Таким образом, установлено взаимное расположение единственного сайта узнавания *SalI*, двух сайтов *BamHI* и двух сайтов *EcoRI* на макси-

Рис. 3. Электрофоретический анализ в 0,7% агарозном геле расщепления максикольцевых молекул кпДНК эндонуклеазами рестрикции. А: а — *EcoRI*, б — *EcoRI*+*SalI*, в — *HindIII*, г — *HindIII*+*EcoRI*, д — *BspI*, е — *BspI*+*EcoRI*, ж — *BspI*+*HindIII*, з — *BspI*+*SalI*, и — *HindIII*+*SalI*. В: а — *BamHI*, б — *SalI*, в — *BamHI*+*SalI*, г — *EcoRI*, д — *BamHI*+*EcoRI*, е — *HindIII*, ж — *HindIII*+*BamHI*, з — *BspI*, и — *BspI*+*BamHI*. В качестве свидетелей использовали смесь *EcoRI*-фрагментов ДНК фара λ и *EcoRI*-фрагментов ДНК плазмиды рВР322. Слева указаны размеры фрагментов ДНК свидетелей в тыс. п.о.

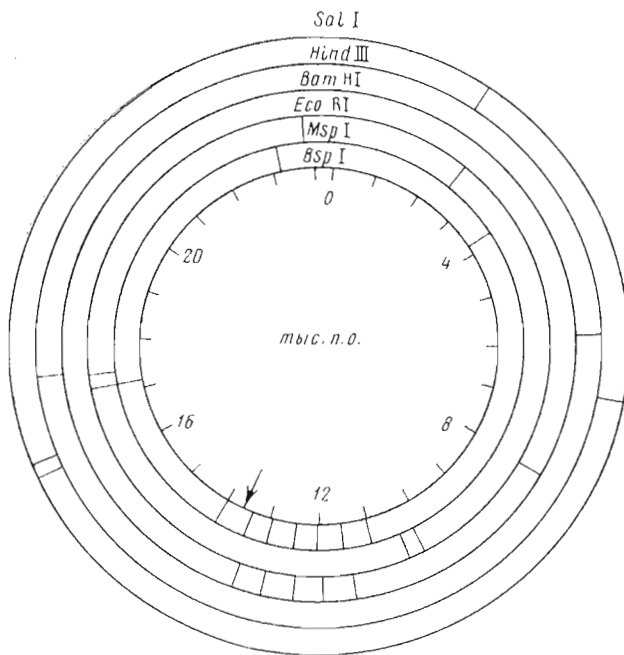


Рис. 4. Рестрикционная карта максиколецевой молекулы кпДНК *Crithidia oncopelti*. Стрелкой обозначен *BspI*-фрагмент, обладающий аномальной электрофоретической подвижностью

кольцевой ДНК кинетопласта *C. oncopelti*. С помощью расщепления максиколецевой ДНК рестриктазами *HindIII*, *HindIII*+*SalI* и *HindIII*+*BamHI* можно установить локализацию трех *HindIII*-сайтов (рис. 3А, в, и; Б, е, ж).

Данные рестрикционного анализа целого ассоциата кпДНК *C. oncopelti* позволяют определить взаимную локализацию лишь нескольких крупных фрагментов максиколецевой ДНК. Карта, составленная на основании этих данных, является неполной, поскольку существуют трудности, связанные с обнаружением и локализацией фрагментов максиколецевой ДНК, которые не превышают по величине миниколецевые ДНК. Для построения полной рестрикционной карты с учетом мелких фрагментов необходимо осуществить клонирование и последующее картирование крупных фрагментов максиколецевой ДНК, взаимная локализация которых может быть установлена непосредственно в результате расщепления целого ассоциата кпДНК. Нам удалось клонировать один из двух *BamHI*-фрагментов величиной 12 тыс. п.о., составляющий около 48% длины максиколецевой молекулы ДНК [11]. С помощью полученной гибридной плазмиды рСо52 удалось определить взаимную локализацию ряда мелких фрагментов, образуемых эндонуклеазами *EcoRI*, *BspI*, *MspI* и *HindIII* (в таблице отмечены звездочкой). Составленная рестрикционная карта представлена на рис. 4. Однако нельзя исключить возможность появления неидентифицированных мелких фрагментов ДНК ($\leq 0,2-0,3$ тыс. п.о.) при расщеплении эндонуклеазами рестрикции второго неклопированного *BamHI*-фрагмента максиколецевой ДНК.

Следует отметить две структурные особенности максиколецевой ДНК. В результате полного расщепления плазмиды рСо52 по *EcoRI*-сайтам образуется фрагмент величиной 0,45 тыс. п.о. в количестве, превышающем эквимолярное [11]. При частичном расщеплении плазмидной ДНК образуются дополнительные фрагменты, эквивалентные двум, трем и четырем фрагментам величиной 0,45 тыс. п.о. Рестриктаза *BspI* полностью расщепляет выделенные фрагменты (0,45 тыс. п.о.) на субфрагменты величиной 0,32 и 0,13 тыс. п.о. Это свидетельствует в пользу однородности исходных фрагментов. На основании этих данных мы предполагаем, что

в максиколецевой молекуле *C. oncopelti* имеется участок, содержащий четырехкратно повторяющуюся последовательность величиной 0,45 тыс. п.о.

Другая особенность заключается в несоответствии подвижности некоторых мелких рестрикционных фрагментов максиколецевой ДНК при электрофорезе в агарозном и полиакриламидном гелях. В наибольшей степени это характерно для *BspI*-фрагмента, отмеченного на рестрикционной карте стрелкой (рис. 4). При электрофорезе в 3% полиакриламидном геле, содержащем 0,5% агарозы, этот фрагмент обладает подвижностью, соответствующей фрагменту величиной 1,05 тыс. п.о., в то время как его величина, определенная по подвижности в 1% агарозном геле, составляет 0,6 тыс. п.о. Подобная вариабельность подвижности отмечена для некоторых миниколецевых фрагментов кпДНК *Leishmania tarentolae* [12, 13]. При этом показано, что определение величины на основе подвижности в агарозном геле более достоверно. Аномальная подвижность рестрикционных фрагментов ДНК может объясняться их необычной пространственной структурой, поскольку в ряде случаев после расщепления таких фрагментов образующиеся субфрагменты не обладают аномальной подвижностью [13].

Сравнение известных рестрикционных карт максиколецевых молекул кпДНК *Trypanosoma brucei* [14, 15], *T. equiperdum* [16, 17] и *L. tarentolae* [2] позволяет выявить общее свойство для всех перечисленных представителей «высших» трипаносомид — наличие в таких молекулах не расщепляемого рестриктазами протяженного А·Т-богатого участка — «silent region» [1]. В случае *C. oncopelti* это может быть последовательность, ограниченная сайтами *Bam*HI и *Bsp*I и составляющая около 20% длины всей молекулы максиколецевой ДНК.

Другая отличительная черта максиколецевой ДНК *C. oncopelti* — наличие участка, возможно, содержащего повторяющуюся последовательность. Представляется интересным выяснить вопрос о функции этой структуры, а также о наличии подобных структур у других представителей «низших» трипаносомид.

Третья особенность кпДНК *C. oncopelti* — значительно меньший размер максиколецевой ДНК (24,5 тыс. п.о.) по сравнению с максиколецевыми кпДНК *C. luciliae* и *C. fasciculata* (38 тыс. п.о.). Это может быть следствием несколько обособленного положения *C. oncopelti* среди других представителей рода *Crithidia*. Довольно неожиданным оказалось то, что максиколецевая ДНК *C. oncopelti* близка по размеру к максиколецевой ДНК *T. mega* [18, 19].

Составленная нами рестрикционная карта максиколецевой молекулы кпДНК *C. oncopelti* в настоящее время используется для транскрипционного картирования, а также для сравнительного изучения организации митохондриального генома «низших» трипаносомид.

Экспериментальная часть

Работу проводили на культуральной форме *Crithidia oncopelti*. Первоначально культура была получена от д-ра О. Ировича (ЧССР). В нашей лаборатории штамм поддерживается в культуральной форме с 1970 г. Выращивание клеток проводили в течение 5–6 сут при 25° С в среде следующего состава (на 1 л): пептон (Chemapol, ЧССР) — 15 г; KH_2PO_4 — 0,5 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 1,8 г; NaCl — 5 г; KCl — 2; глюкоза — 10 г и бромид тиамин — 6 мг.

Ассоциат кпДНК выделяли способом, разработанным нами на основе описанных ранее методов [14, 20]. Способ основан на избирательном осаждении быстроседimentирующего ассоциата кпДНК при центрифугировании лизата клеток. 10 г биомассы *C. oncopelti* суспендировали в 150 мл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 250 мМ EDTA и 100 мМ NaCl. К суспензии клеток добавляли SDS (Serva, ФРГ) до конечной концентрации 1% и после инкубации при 60° С в течение 10–15 мин добавляли проназу Е (Merck, ФРГ), преинкубированную 30 мин при 37° С, до концентрации 100 мкг/мл. Лизис клеток проводили 1,5–2 ч при 60° С при

небольшом перемешивании. Лизат центрифугировали 5 мин со скоростью 40 000g при 20° С на центрифуге «Beckman J-21С» (ротор JA-20). Кинетопластную ДНК, содержащуюся в надосадочной жидкости, осаждали центрифугированием в течение 90 мин со скоростью 40 000g при 20° С. Осадок кпДНК суспендировали в 100 мл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 8,0), 100 мМ EDTA и 100 мМ NaCl, обрабатывали 30 мин при 37° С панкреатической РНКазой (100 мкг/мл), затем 30 мин при 37° С проназой Е (50 мкг/мл). Далее ДНК дважды депротенизировали фенолом или смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). КпДНК осаждали в течение 90 мин со скоростью 40 000g при 5° С. Для удаления примесей ядерной ДНК осаждение повторяли дважды, осадок кпДНК далее растворяли в 5 мл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, и осаждали этанолом. Конечный выход кпДНК составляет 400—500 мкг. В ряде случаев для дополнительной очистки использовали препаративное ультрацентрифугирование кпДНК в градиенте плотности CsCl в присутствии бромистого этидия (300 мкг/мл). Исходное преломление раствора ДНК доводили до значения $n_{25} = 1,3890$, центрифугирование проводили в течение 40 ч при 142 000g на ультрацентрифуге К-32 (ротор У-65).

Препараты эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PstI* получали по методу Кузьмина с соавт. [24]. Эндонуклеазы *EcoRI*, *SalI*, *HindIII*, *BamHI*, *BspI* и *MspI* были любезно предоставлены А. А. Янулайтисом (ВНИИ прикладной энзимологии, г. Вильнюс) и Н. П. Кузьминым (ИБФМ АН СССР, г. Пущино); *SmaI*, *XhoI* и *EcoRII* были получены с завода ферментативных препаратов при ИБФМ АН СССР. Обработку ДНК рестриктазами *EcoRI*, *BamHI* и *SalI* проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂; рестриктазами *XhoI*, *BspI*, *KpnI*, *MspI* и *HindIII* — в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂; рестриктазой *PstI* — в буфере, содержащем 90 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂; рестриктазой *EcoRII* — в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 1 мМ EDTA; рестриктазой *SmaI* — в буфере, содержащем 15 мМ трис-НСl (рН 9,0), 6 мМ MgCl₂, 15 мМ KCl. При обработке ДНК эндонуклеазой *PstI* инкубацию проводили при 30° С, в остальных случаях — при 37° С.

Фрагменты максикольцевой ДНК разделяли электрофорезом в 0,7% агарозном теле (160×160×3 мм, агароза — «Sigma», тип II) с использованием электродного трис-ацетатного буфера, содержащего 40 мМ трис-ацетат (рН 7,7), 20 мМ ацетат натрия и 2 мМ EDTA. Гели окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл) и фотографировали в ультрафиолете с использованием красного светофильтра.

Для определения величины фрагментов ДНК в качестве свидетелей использовали *EcoRI*-фрагменты ДНК фага λ [22] и *EcoRII*- или *BspI*-фрагменты ДНК плазмиды pBR322 [23].

Электронную микроскопию ДНК проводили по методу Дэвиса и др. [24], в качестве стандарта использовали плазмиду pBR322 (1,33±±0,08 мкм).

Авторы выражают благодарность А. А. Янулайтису и Н. П. Кузьмину за любезное предоставление препаратов рестриктаз, Л. Э. Якубову за помощь в электронно-микроскопической характеристике кпДНК, В. В. Асееву и Н. П. Кузьмину за обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borst P., Hoeymakers J. H. J. Plasmid, 1979, v. 2, № 1, p. 20—40.
2. Masuda H., Simpson L., Rosenblatt H., Simpson A. Gene, 1979, v. 6, № 1, p. 51—73.
3. Hoeymakers J. H. J., Borst P. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 521, № 2, p. 407—411.
4. Зайцева Г. Н., Мерт Н. Л., Маслов Д. А., Лунина Л. Д., Колесников А. А. Биохимия, 1979, т. 44, № 10, с. 2073—2082.
5. Brunel F., Davison J., Vinh Ha Thi, Merchez M. Gene, 1980, № 12, p. 223—234.
6. Donelson J. E., Majiwa P. A. O., Williams R. O. Plasmid, 1979, № 2, p. 572—588.
7. Brack Ch., Bickle T. A., Yuan R. D. C., Baker D. C., Foulkes M., Newton B. A., Jenney L. In: Biochemistry of parasites and host-parasite relationships/Ed. van de Bosshe H. Amsterdam/North-Holland publishing Co., 1976, p. 211—218.

8. Englund P. T. Cell, 1978, v. 14, № 1, p. 157-168.
9. Weislogel P. O., Hoeijmakers J. H. J., Fairlamb A. H., Kleisen C. M., Borst P. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 478, № 1, p. 167-179.
10. Steinert M., Van Assel S. Exp. Cell Res., 1976, v. 96, № 2, p. 406-409.
11. Маслов Д. А., Энгелус Н. С., Колесников А. А., Зайцева Г. П., Кузьмин Н. П., Фодор Н. И. Докл. АН СССР, 1984, т. 261, № 5, с. 1271-1273.
12. Simpson L., Simpson A. M., Kidane G., Livingston D., Spithill T. W. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1980, v. 29, № 5, Suppl., p. 1053-1062.
13. Challberg S. S., Englund P. T. J. Mol. Biol., 1980, v. 138, № 5, p. 447-472.
14. Stuart K. Plasmid, 1979, v. 2, № 3, p. 520-528.
15. Borst P., Fase-Fowler F. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 565, № 1, p. 1-12.
16. Riou G. F., Sausier J.-M. J. Cell. Biol., 1979, v. 82, № 2, p. 248-263.
17. Frasch A. C. C., Hajduk S. L., Hoeijmakers J. H. J., Borst P., Brunel F., Davison J. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 607, № 2, p. 397-400.
18. Borst P., Fase-Fowler F., Steinert M., Van Assel S. Exp. Cell Res., 1977, v. 110, № 2, p. 167-173.
19. Borst P., Hoeijmakers J. H. J., Hajduk S. L. Parasitology, 1981, v. 82, № 1, p. 81-93.
20. Cheng D., Simpson L. Plasmid, 1978, v. 1, № 2, p. 297-315.
21. Кузьмин Н. П., Фодор Н. И., Бабев А. А. Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 2, с. 477-480.
22. Daniels D. L., de Wet J. R., Blattner F. R. J. Virology, 1980, v. 33, № 2, p. 390-400.
23. Sutcliff J. G. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 8, p. 2721-2728.
24. Davis R. W., Simon M., Davison N. In: Methods in Enzymology. Vol. XXI. Nucleic Acids/Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.-London: Acad. Press, 1974, p. 413-428.

Поступила в редакцию
18.XI.1984

KINETOPLAST DNA FROM *CRITHIDIA ONCOPELTI*. RESTRICTION MAPPING OF MAXICIRCULAR DNA

MASLOV D. A., ENTELIS N. S., KOLESNIKOV A. A.,
ZAITSEVA G. N.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Kinetoplast DNA (kDNA) from lower trypanosomatid *Crithidia oncopelti* exists in the form of a network of interlocked minicircular and maxicircular molecules. Minicircles which represent the main component of networks are heterogeneous both in size (1,1-2,6 kilobasepairs, kbp), and in base sequence. Maxicircular molecules are homogeneous; their size revealed by restriction analysis is about 24,5 kbp. Restriction map for endonucleases *SalI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *BspI* and *MspI* was constructed on the basis of cleavage data of the whole network and pCo52 hybrid plasmid carrying 12 kbp maxicircular insert generated by *Bam HI*.