



УДК 577.113.5

СТРУКТУРА УЧАСТКА РЕКОМБИНАЦИИ В ДНК
ТРАНСДУЦИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА λ plac5

Шпаковский Г. В., Берлин Ю. А.

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

Для выяснения молекулярных механизмов сайт-специфической рекомбинации большой интерес представляют сведения о нуклеотидной последовательности участков генома, где происходит обмен генетическим материалом. В связи с этим мы обратились к изучению бактериофага λ plac5, в ДНК которого содержится фрагмент лактозного оперона *E. coli* [1–3]. Было использовано производное этого бактериофага — λ plac5-2, сохранившее в составе ДНК два из пяти *EcoRI*-сайтов исходного λ plac5 [4]. Между этими двумя сайтами расположен почти весь интегрированный участок бактериальной ДНК — дистальный конец гена *lacI*, промотор и оператор *lac*-оперона и почти весь ген *lacZ*; дистальный конец этого гена (участок длиной 62 н.п. [5]) расположен по другую сторону *EcoRI*-сайта, в составе *EcoRI*, *KpnI*-фрагмента длиной около 750 н.п. Оба *KpnI*-сайта ДНК самого фага λ , судя по результатам рестрикции, присутствуют и в ДНК λ plac5. В то же время ген *lacY*, следующий в составе *lac*-оперона за геном *lacZ* и имеющий длину свыше 1200 н.п., что значительно превышает размер *EcoRI*, *KpnI*-фрагмента ДНК λ plac5-2, не содержит *KpnI*-сайтов [6]. Отсюда следует, что одно из сочленений бактериальной и фаговой ДНК в λ plac5 располагается между *EcoRI*- и ближайшим к нему *KpnI*-сайтом. Поэтому вначале мы клонировали *EcoRI*, *KpnI*-фрагмент ДНК λ plac5-2, метили его по *EcoRI*-концу с помощью ДНК-полимеразы I и [α -³²P]dATP, обрабатывали еще одной рестриктазой и с помощью электрофореза в полиакриламидном геле определяли расстояние между *EcoRI*-сайтом и ближайшим к нему сайтом этой рестриктазы. Полученные данные мы сравнили с рестриктной картой дистального конца гена *lacZ*, межгенного участка *Z*—*Y* и проксимального конца гена *lacY* [6]. Оказалось, что одно из сочленений бактериальной и фаговой ДНК в составе λ plac5-2 расположено между сайтами рестриктаз *BcnI* [7] (65 н.п. от *EcoRI*-сайта; содержится также в межгенном участке *Z*—*Y* ДНК *E. coli* [6]) и *CfrI* [8] (142 н.п. от *EcoRI*-сайта; отсутствует в структуре [6]).

Далее мы выделили соответствующий участок ДНК фага λ С1857. Для этого *KpnI*, *SmaI*-фрагмент этой ДНК (~680 н.п.) расщепили рестриктазой *CfrI* и гидролизат сравнили с *CfrI*-гидролизатом упоминавшегося выше *EcoRI*, *KpnI*-фрагмента ДНК λ plac5-2. Оказалось, что вместо фрагмента 142 н.п. (*EcoRI*, *CfrI*-фрагмент ДНК λ plac5-2) появляется фрагмент 72 н.п. (*SmaI*, *CfrI*-фрагмент ДНК λ). Оба этих фрагмента были проанализированы методом Максама — Гилберта [9]; результаты определения их первичной структуры вместе с нуклеотидной последовательностью участка бактериальной ДНК [6] частично представлены на рисунке.

Как видно из этих данных, вставка бактериальной ДНК заканчивается сразу же после межгенного участка *Z*—*Y*, непосредственно перед иницирующим триплетом ATG гена *lacY*, причем в составе λ plac5-2 бак-

						Зона кроссинговера						
ДНК λ	5'CCCGGG.....	GTGATTTACC	GTCTTACCGTTC	TACGGTAATCC	CATTTGTATCTCC	CGGACCACC	CGACTGTGAGCC	CACTCGGCCAGGTACC		
ДНК <i>E. coli</i> [6]	5'	<i>lacZ</i>	межгенный участок Z-YGCCCCG	TATTCGCGTA	AAGGAATCC	CATTTGTATCT	ATTATAA	AAACAACT	TTTGGATG	TTTC.....	
ДНК λ <i>rlac5</i> -2	5'GAATTC.....	CCCGGG.....GCCCG	TATTCGCGTA	AAGGAATCC	CATTTGTATCT	CCCG	CACC	CGACTGTGAGCC	CACTCGGCCAGGTACC.....
		EcoRI	BcnI							CfrI	KpnI	

Локализация участка рекомбинации при образовании трансдуцирующего бактериофага λ*rlac5* (изображены смысловая цепь бактериальной ДНК и гомологичные ей цепи фаговых ДНК)

териальная ДНК переходит в фаговую без каких-либо нарушений последовательности. Отсюда следует, что, вопреки прежним представлениям [2], бактериальная вставка в составе ДНК λ*rlac5* вообще не содержит фрагмента гена *lacY*.

Сопоставление трех обсуждающихся нуклеотидных последовательностей позволяет в фаговой и бактериальной ДНК выделить зону структурного соответствия длиной около 20 н.п., отвечающую участку кроссинговера; к ней примыкает зона значительного преобладания G-C-пар в ДНК λ и A-T-пар в ДНК *E. coli*. Следует отметить, что зона кроссинговера в составе бактериальной ДНК содержит два дополнительных нуклеотидных звена АТ (на рисунке подчеркнуты волнистой линией). Мы предполагаем, что именно эти звенья служат сигналом для ферментов рекомбинации: нарушая идеальность гетеродуплекса, образующегося на начальных этапах процесса, они определяют место специфического эндонуклеазного разрыва цепи (точку кроссинговера); дальнейшие стадии включают экзонуклеазное отщепление двух «лишних» звеньев (АТ) бактериальной ДНК и реципрокный обмен между обеими ДНК.

Что касается противоположного конца бактериальной вставки, то он должен быть расположен в гене *lacI* (см. [2, 10]). Поэтому мы сопоставили рестриктивные карты этого гена [11] и соответствующей области ДНК λ*rlac5*-2. Оказалось, что второе сочленение бактериальной и фаговой ДНК в λ*rlac5* находится между сайтами рестриктаз *HindII* (нуклеотиды 854—859 гена *lacI*; содержится в обеих ДНК) и *BcnI* (нуклеотиды 779—783; содержится в гене *lacI*, но отсутствует в ДНК λ*rlac5*-2); это означает, что в состав ДНК λ*rlac5* входит примерно четверть гена *lacI* (дистальный конец). Мы полагаем, что данный участок рекомбинации расположен вблизи упомянутого выше *HindII*-сайта.

Следует отметить, что изучение структуры обоих участков сайт-специфической рекомбинации важно для выяснения механизма аномального исключения фага λ из бактериальной хромосомы (см. [1, 12]), приводящего к образованию трансдуцирующих фагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ippen K., Shapiro J. A., Beckwith J. R. J. *Bacteriol.*, 1971, v. 108, № 1, p. 5—9.
2. Shapiro J., MacHattie L., Eron L., Ihler G., Ippen K., Beckwith J. *Nature*, 1969, v. 224, № 5221, p. 768—774.
3. Malamy M. H., Fiandt M., Szybalski W. *Molec. Gen. Genet.*, 1972, v. 119, № 3, p. 207—222.
4. Pourcel C., Marchal C., Louise A., Fritsch A., Tiollais P. *Molec. Gen. Genet.*, 1979, v. 170, № 2, p. 161—169.
5. Микрюкова Н. Н., Петров Н. А., Каргинов В. А., Василенко С. К. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1735—1736.
6. Büchel D. E., Gronenborn B., Müller-Hill B. *Nature*, 1980, v. 283, № 5747, p. 541—545.
7. Janulaitis A. A., Petrušytė M. P., Jaskelevičienė B. P., Krayev A. S., Skryabin K. G., Bayev A. A. *FEBS Lett.*, 1982, v. 137, № 2, p. 178—180.
8. Janulaitis A. A., Stakenas P. S., Lebedenko E. N., Berlin Yu. A. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 20, p. 6524—6530.
9. Maxam A. M., Gilbert W. In: *Methods in Enzymology* / Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499—560.
10. Calos M. P. *Nature*, 1978, v. 274, № 5673, p. 762—765.
11. Farabaugh P. J. *Nature*, 1978, v. 274, № 5673, p. 765—769.
12. Nash H. A. In: *Ann. Rev. Genet.* / Eds Roman H., Campbell A., Sandler L. N. Y.: Annual Reviews Inc., 1981, v. 15, p. 143—167.

Поступило в редакцию
7.II.1983

STRUCTURE OF A RECOMBINATION SITE IN THE TRANSDUCING
BACTERIOPHAGE λ plac5 DNA

SHPAKOVSKII G. V., BERLIN Yu. A.

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

A recombination site in the transducing bacteriophage λ plac5 DNA has been structurally elucidated. Comparison of primary structures of *E. coli lac*-operon (distal end of *lacZ* gene, Z-Y spacer, and proximal end of *lacY* gene) described earlier with corresponding segments of bacteriophages λ CI857 and λ plac 5-2 DNAs sequenced in this paper showed that the bacterial DNA insert ends immediately after Z-Y spacer, just before the initiating triplet ATG of *lacY* gene. It thus follows that in contrast to the earlier conception, the insert does not seem to include any part of *lacY* gene. The recombination sites in both phage and bacterial DNA contain structurally homological segments about 20 b. p. long (crossover region), with two extra basepairs in the bacterial DNA (AT in the sense-strand). We suppose that the very dinucleotide plays a substantial role in initiation of recombinational event: causing formation of a nonperfect heteroduplex structure, it determines the T-A internucleotide bond to be endonucleolytically cut (crossover point) followed by exonucleolytic elimination of the extra links (AT) and reciprocal strand exchange. The second recombination site in λ plac5 DNA has been localized by us within *lacI* gene as being close to the *HindII* site (nucleotides 854 to 859 of the gene). The structures of the two regions of site-specific recombination may shed light upon mechanisms of the phage abnormal excision leading to formation of transducing phages.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 21.02.83 Подписано к печати 06.04.83 Т-07121 Формат бумаги 70×108^{1/16}
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,1 тыс. Уч.-изд. л. 14,2 Бум. л. 4,5
Тираж 866 экз. Зак. 2532

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10