



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.21

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ В РАЙОНАХ
КАНОНИЧЕСКИХ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК
БАКТЕРИОФАГА ϕ_k F77 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Ксензенко В. Н., Шляпников М. Г., Кулаков Л. А.*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР,
Пушино Московской обл.;*** Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
Министерства здравоохранения РСФСР, Горький*

Ранее нами была охарактеризована группа фагов ϕ_k , специфичных к *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Интересной особенностью этих фагов является наличие однонитевых канонических разрывов (ников) в молекуле их ДНК. Эти разрывы могут быть репарированы ДНК-лигазой фага T4 и, следовательно, содержат смежные 5'-фосфатные и 3'-гидроксильные группы. Аналогичная особенность структуры ДНК была описана для некоторых бактериофагов [2, 3] и детально изучена на примере фага T5 *Escherichia coli*.

В настоящей работе приводятся данные по изучению нуклеотидной последовательности ДНК в районах ников у одного из представителей указанной группы фагов *P. aeruginosa* (ϕ_k F77). Стратегия определения нуклеотидной последовательности состояла в следующем. Прежде всего определялись 5'-концевые нуклеотидные последовательности трех однонитевых фрагментов ДНК, полученных щелочной денатурацией с последующим разделением электрофорезом в агарозном геле [1] и меченных фосфором-32 с помощью полинуклеотидкиназы фага T4. Все они имеют концевой нуклеотид рС, что было установлено методом ТСХ на целлюлозе [4] продуктов их полного гидролиза смесью ДНКазы I и фосфодиэстеразы (ФДЭ) змеяного яда. Анализ по сдвигу [4] концевых последовательностей этих фрагментов (рис. 1а) показывает наличие у них общей последовательности — рСТСС. Секвенирование методом Максама — Гилберта [5] данных фрагментов (рис. 1б) выявило более протяженную гомологию 5'-концевых последовательностей — рСТССGG, а у двух из них — рСТССGGGG (рис. 2).

Исходя из установленных последовательностей 5'-концевых сегментов, мечение 3'-концов в никах проводили с помощью ДНК-полимеразы I [6] в присутствии единственного трифосфата [α -³²P]dCTP. Индивидуальные меченые однонитевые фрагменты ДНК секвенировали методом Максама — Гилберта с той лишь разницей, что продукты химической деградации анализировали двумерной ТСХ на целлюлозе (рис. 1б). Общей 3'-концевой последовательностью для всех четырех изученных фрагментов является тетрапуклеотид — ССТАоh. В некоторых случаях обнаруживается также более протяженная гомология (рис. 2).

Хотя нам не удалось проанализировать 5'-концевую последовательность одного из однонитевых фрагментов (рис. 2а), мы полагаем, что районы всех четырех ников фага ϕ_k F77 содержит идентичные последовательности из 10 нуклеотидов: ССТАоhрСТССGG.

С целью выяснения особенностей структуры ДНК на более протяженных участках в районах ников мы предприняли попытки клонировать фрагменты ДНК фага ϕ_k F77, содержащие однонитевые канонические разрывы. Нам удалось клонировать только один из таких фрагментов —

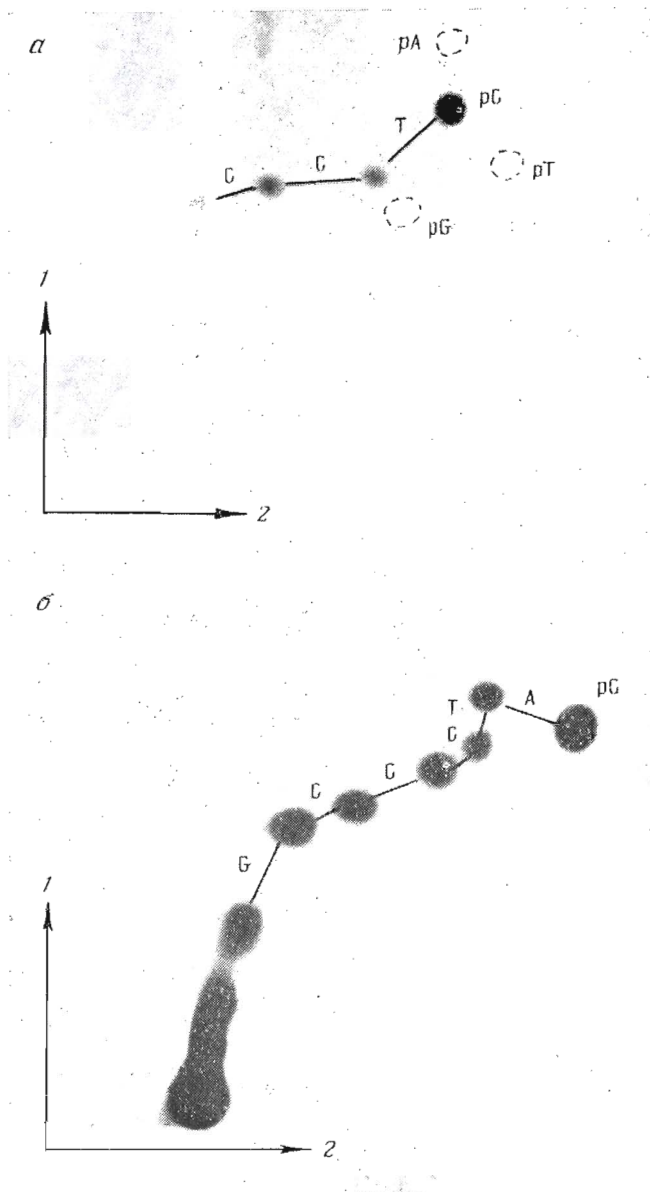


Рис. 1. Двумерная ТСХ на целлюлозе продуктов ограниченного гидролиза одного из $5'$ - ^{32}P -меченых однонитевых фрагментов ДНК фага $\phi_{\text{r}}\text{F77}$ смесью ДНКазы I и ФДЭ змеиного яда (а) и продуктов химической деградации по методу Максама — Гилберта (смесь продуктов модификации по А+Г и С+Т) одного из $3'$ - ^{32}P -меченых однонитевых фрагментов ДНК указанного выше фага (б). 1 — изомасляная кислота — 0,5 М NH_4OH (5:3 по объему, рН 3,7), 2 — *трет*-бутанол — 0,075 М HCOONH_4 (рН 3,8) (1:1 по объему), рН 4,8, 15° С. Пунктирной линией обозначены УФ-поглощающие маркеры

EcoRV-HindIII-фрагмент размером 190 п.о. в плазмиде pUC9. Анализ его нуклеотидной последовательности методом Максама — Гилберта и сравнение ее с последовательностью в районах других ников не выявили каких-либо интересных структурных особенностей, за исключением наличия инвертированного повтора, отмеченного на рис. 2. Аналогичные повторы обнаружены в районах однонитевых разрывов ДНК фага T5 [7]. Возможно, что данная особенность структуры, а также последовательности вне участка гомологии влияют на эффективность узнавания субстрата соответствующей нуклеазой (нуклеазами).

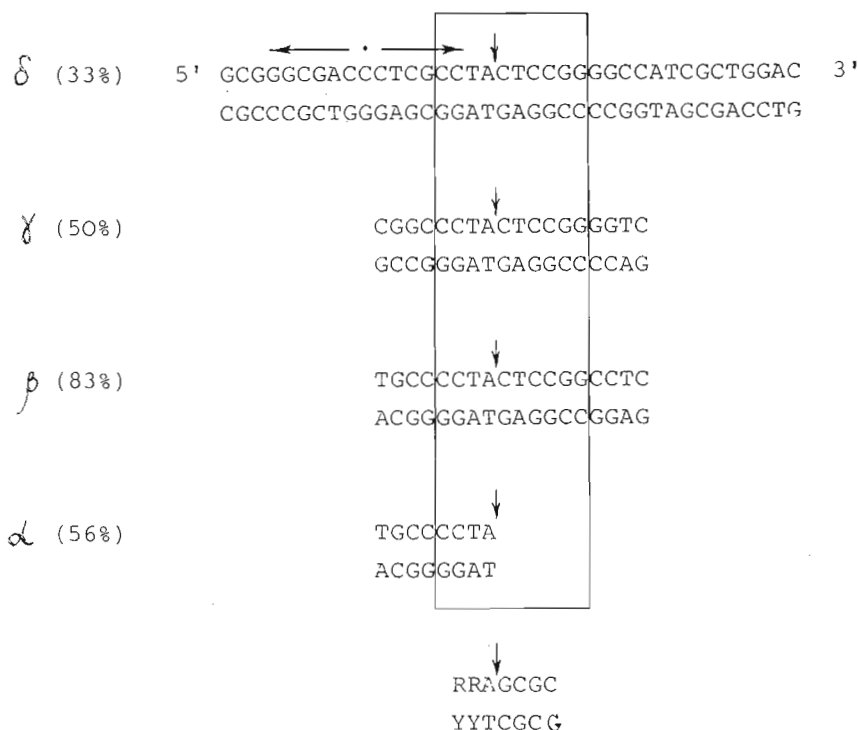


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность в районах однонитевых канонических разрывов ДНК фага $\phi_k F77$. Общая последовательность заключена в рамку. Вертикальными стрелками отмечены места однонитевых разрывов. Горизонтальными стрелками отмечен инвертированный повтор. Частота встречаемости ников в популяции молекул ДНК по данным электронной микроскопии указана в левой части рисунка. В нижней части рисунка представлена обобщенная последовательность в районах ников фага T5

Интересно, что гомологичные последовательности в районах ников у бактериофага T5 представлены лишь пятью нуклеотидами -- AohpCGCG [7]. Количество однонитевых канонических разрывов у этого фага хорошо согласуется с расчетной частотой встречаемости данной последовательности в фаговом геноме [7]. Обнаруженная у $\phi_k F77$ в районах ников последовательность из 10 нуклеотидов уникальна для фаговой ДНК такого размера (44 тыс. п.о.). Таким образом, гомология ДНК в районах ников фага $\phi_k F77$, по-видимому, обязана своим происхождением определенному направлению эволюции фагового генома. Следует отметить, что общие нуклеотидные последовательности в районах ников фага $\phi_k F77$, как и в случае фага T5, не обладают двусторонней симметрией. Возможно, такая особенность структуры сайта узнавания характерна для эндонуклеаз, ответственных за внесение разрывов лишь в одну из цепей ДНК.

Ранее предпринимались попытки выделить ферменты, ответственные за внесение ников в ДНК фага T5 [8]. Однако обнаруженные нуклеазы ни по отдельности, ни в каких-либо комбинациях не были способны *in vitro* вносить однонитевые разрывы в репарированную ДНК фага T5 в тех сайтах, в которых такие разрывы обнаруживаются в молекулах ДНК, выделенных из фаговых частиц [8]. Выделение таких эндонуклеаз существенно затруднено сложностью их тестирования. Имеющийся в нашем распоряжении клоноированный фрагмент ДНК фага $\phi_k F77$, содержащий область одного из ников, может служить субстратом для выявления ферментативных активностей, ответственных за внесение ников в ДНК этого бактериофага.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kulakov L. A., Ksenzenko V. N., Kochetkov V. V., Mazepa V. N., Boronir A. M. // Mol. Gen. Genet. 1985. V. 200. № 1. P. 123–127.
2. McCorquadale D. J. // Critical Rev. Microbiol. 1975. V. 4. № 2. P. 101–159.
3. Hemphill H. E., Whiteley H. R. // Bacteriol. Rev. 1975. V. 39. № 3. P. 257–315.
4. Shlyapnikov M. G., Kaliman A. V., Kazantsev S. I., Kryukov V. M., Bayev A. A. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 782. № 3. P. 313–319.
5. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560–564.
6. Nichols B. P., Donelson J. E. // J. Virol. 1977. V. 22. № 2. P. 520–526.
7. Nichols B. P., Donelson J. E. // Virology. 1977. V. 83. № 2. P. 396–403.
8. Rogers S. G., Rhoades M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 5. P. 1576–1580.

Поступило в редакцию

23.XII.1986

После доработки

19.III.1987

NUCLEOTIDE SEQUENCE AROUND NATIVE NICKS IN DNA FROM THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGE ϕ_k F77

KSENZENKO V. N., SHLYAPNIKOV M. G., KULAKOV L. A.*

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino, Moscow Region: * Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology, Gorky*

It is known that DNA molecules from the phage group ϕ_k specific to *Pseudomonas aeruginosa* possess single-strand breaks (nicks). The sequences around the nicks in the bacteriophage ϕ_k F77 DNA have been determined by various methods. In addition, an *EcoRV* – *HindIII* fragment, containing a nick, was cloned into the plasmid pUC9 and sequenced by Maxam – Gilbert technique. The sequence common for all nicks was CCTAohpCTCCGG.