



УДК 547.962.32.02 : 577.155

**ФРАГМЕНТЫ ДНК ФАГА λ , ПОЛУЧАЕМЫЕ
ПРИ ОБРАБОТКЕ ГЕТЕРОДУПЛЕКСНЫХ ДНК НУКЛЕАЗОЙ S_1** ***Свердлов Е. Д., Монастырская Г. С., Вудовский Э. И.,
Петров Н. А.****Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Методом расщепления гетеродуплексных ДНК нуклеазой S_1 выделены и идентифицированы два фрагмента ДНК фага λ . Литературные данные по расположению областей гомологии ДНК лямбдоидных фагов, использованных для конструирования гетеродуплексов, позволяют заключить, что один из фрагментов содержит промоторы и операторы ранней транскрипции, программируемой ДНК фага λ , а другой — один из промоторов поздней транскрипции.

При установлении первичной структуры дезоксирибонуклеиновых кислот важнейшей проблемой является выделение нужного фрагмента ДНК и его идентификация. Наиболее широко в настоящее время для решения этой проблемы используются ферменты рестрикции (см. обзоры [1, 2]), однако при расщеплении ими ДНК получается довольно большой набор фрагментов, которые трудно разделять. Необходимы другие методы расщепления ДНК, которые позволяли бы выделять нужные фрагменты более просто. В последнее время пытаются применять расщепление гетеродуплексных ДНК с помощью нуклеаз, специфически расщепляющих одноцепочечные и не затрагивающих двухцепочечные ДНК [3—6]. Этот метод дает возможность легко выделять генетически определенные фрагменты ДНК, которые при необходимости могут быть расщеплены далее ферментами рестрикции. В нашей работе описано использование этого метода для получения двух фрагментов ДНК бактериофага λ . Один из этих фрагментов содержит промоторы и операторы ранней транскрипции, программируемой ДНК бактериофага λ , другой — один из промоторов поздней транскрипции.

Обнаружение и идентификация фрагмента ДНК фага λ , содержащего промотор поздней транскрипции. На рис. 1 представлены генетические карты трех лямбдоидных бактериофагов: λ , λi^{434} и λh^{80} [7,8]. ДНК первых двух из них различаются только в области иммунности, расположенной на расстоянии, составляющем 73% длины ДНК λ от ее левого конца, и занимающей $\sim 5\%$ всей длины ДНК. Теоретически, если смесь двух таких ДНК денатурировать, а затем ренатурировать, должно образоваться несколько продуктов ренатурации (рис. 2): две исходные молекулы *a* и *b* и два различных гетеродуплекса *в* и *г*. Содержание гетеродуплексов в этой смеси составляет половину общего количества ренатурированной ДНК при условии, что участок негомологии между ДНК достаточно мал. Если

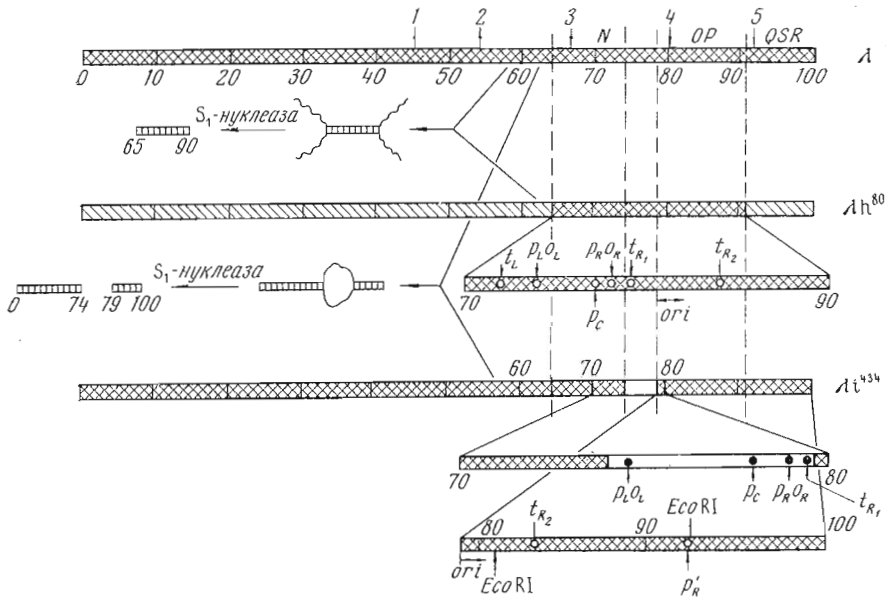


Рис. 1. Генетические карты ДНК фагов λ , λi^{434} и λh^{80} [7, 8]. Цифры обозначают процентные доли полной длины молекулы ДНК. N, O, P, Q, S, R — гены, p — промотор, o — оператор, t — терминатор; подстрочные индексы L и R относятся к левой и правой транскрипции соответственно. Стрелками указаны места расщепления рестриктазой *Eco* RI [10]

смесь далее расщепить нуклеазой S_1 , специфичной к одноцепочечной ДНК, то молекулы исходных ДНК a и b останутся нетронутыми, тогда как каждый из гетеродуплексов даст два фрагмента длиной ~ 80 и 20% ДНК λ . Более короткий из этих фрагментов содержит промотор поздней транскрипции ДНК λ — p_R' [7]. Действительно, когда смесь ДНК λ и λi^{434} была денатурирована и затем ренатурирована, после ее расщепления нуклеазой S_1 при электрофорезе в агарозном геле были найдены две полосы (рис. 3, *e*), которые не обнаруживаются, если подобной обработке подвергнуть отдельно каждую из этих ДНК (рис. 3, *e, z*) или если смесь после ренатурации не обрабатывать S_1 -нуклеазой (рис. 3, *d*). Можно полагать поэтому, что более интенсивная верхняя полоса представляет собой неразделенную смесь исходных молекул ДНК λ , λi^{434} и более длинного фрагмента, образующегося при расщеплении гетеродуплексных молекул.

Более подвижная полоса, очевидно, соответствует участку ДНК λ от 79 до 100% длины, считая с левого конца. Этот вывод подтвержден следующим образом. Во-первых, был определен молекулярный вес более короткого фрагмента сопоставлением его подвижности при электрофорезе в агарозном геле с подвижностью фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК бактериофага λ рестрикционной эндонуклеазой *Eco*RI (рис. 3, *ж; 4*). Полученное значение $(6,41 \pm 0,05) \cdot 10^6$ очень близко к ожидаемому $(6,4 \cdot 10^6)$, исходя из положения областей гомологии λ и λi^{434} на генетической карте. Во-вторых, этот фрагмент был выделен путем элюции из агарозного геля и подвергнут расщеплению рестрикционной эндонуклеазой *Eco*RI, которая, как известно [9, 10], расщепляет ДНК в пяти местах (рис. 1) и дает шесть фрагментов (рис. 3, *з*). Два из пяти мест расщепления расположены в коротком фрагменте, соседнем с областью негомологии λ и λi^{434} , с правой стороны от нее. При расщеплении этого участка образуются фрагменты Е и F (рис. 4). При электрофорезе фрагментов, получающихся после расщепления выделенного нами участка ДНК, обнаруживаются два фрагмента, соответствующие по подвижности фрагментам Е и F,

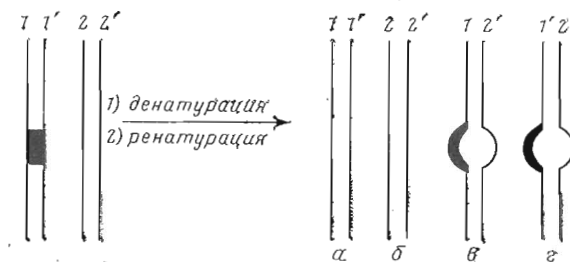


Рис. 2. Схематическое изображение денатурации и ренатурации смесей двух ДНК

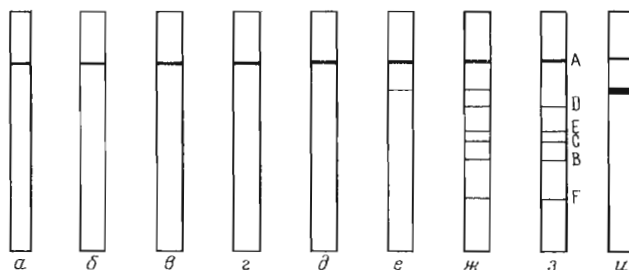


Рис. 3. Электрофорез в агарозном геле гомо- и гетеродуплексов λ и λi^{434} , обработанных и не обработанных S_1 -нуклеазой: а — гомодуплекс λ , рН 4,6; б — гомодуплекс λi^{434} , рН 4,6; в — гомодуплекс $\lambda + S_1$ -нуклеаза; г — гомодуплекс $\lambda i^{434} + S_1$ -нуклеаза; д — гетеродуплекс $\lambda - \lambda i^{434}$, рН 4,6; е — гетеродуплекс $\lambda - \lambda i^{434} + S_1$ -нуклеаза; ж — гетеродуплекс $\lambda - \lambda i^{434}$, обработанный S_1 -нуклеазой, в рестрикте ДНК фага λ ; з — рестрикт ДНК фага λ ; и — фрагмент гетеродуплексов $\lambda - \lambda i^{434}$ после центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы

образующимся при аналогичном расщеплении целой ДНК. Таким образом, выделенный нами фрагмент представляет собой участок ДНК λ , находящийся непосредственно справа от области негомологии между λ и λi^{434} .

Поскольку различие в молекулярных весах между образующимися в результате расщепления нуклеазой S_1 продуктами достаточно велико, они могут быть разделены ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (рис. 5), хотя для чистого выделения более короткого фрагмента этим способом необходимо повторное центрифугирование. (После первого центрифугирования этот фрагмент еще содержит заметные количества других продуктов ренатурации (рис. 3, и).)

Получение фрагмента ДНК λ , содержащего промоторы и операторы ранней транскрипции. В отличие от ДНК λi^{434} ДНК фага λh^{80} имеет по сравнению с ДНК λ относительно короткий участок гомологии (рис. 1), расположенный в области 64,5—90,6% длины ДНК λ , считая с левого конца [8]. При денатурации и ренатурации смеси ДНК λ и λh^{80} наряду с исходными молекулами должны образовываться гетеродуплексные молекулы, имеющие в средней части двухцепочечный фрагмент, соответствующий области гомологии, а по краям одноцепочечные «хвосты», соответствующие негомологичным областям. Действительно, при денатурации и ренатурации смеси ДНК λ и λh^{80} и обработке полученных продуктов нуклеазой S_1 мы наблюдали с помощью электрофореза в агарозном геле образование фрагмента, имеющего большую подвижность по сравнению с исходными ДНК. Этот фрагмент не образовывался при аналогичной обработке отдельных ДНК или когда обработка нуклеазой S_1 не производилась (рис. 3). Для идентификации этого фрагмента был определен его молеку-

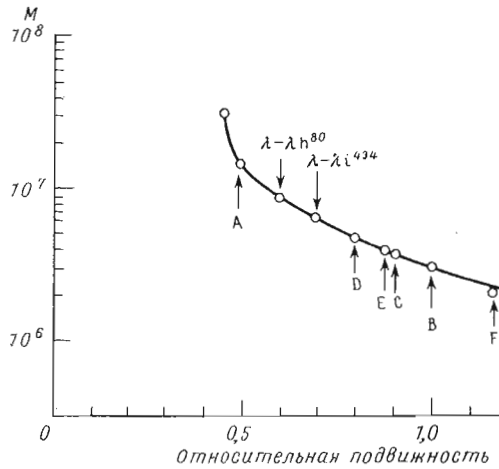


Рис. 4. Относительные электрофоретические подвижности фрагментов рестрикта ДНК λ и фрагментов, получающихся при обработке гетеродуплексов $\lambda - \lambda i^{434}$ и $\lambda - \lambda h^{80}$ нуклеазой S_1 . Связь подвижности фрагментов при электрофорезе с молекулярным весом фрагментов

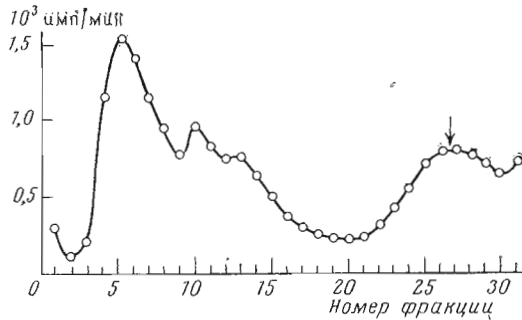


Рис. 5. Разделение S_1 -гидролизата гетеродуплекса $\lambda - \lambda i^{434}$ центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы. Стрелкой указано положение короткого фрагмента, соответствующего участку ДНК λ 79—100%

лярный вес на основе сопоставления его электрофоретической подвижности с подвижностью фрагментов, получающихся при расщеплении ДНК λ эндонуклеазой *EcoRI* (рис. 4). Полученное значение M ($8,08 \pm 0,05$) $\cdot 10^6$ очень близко к ожидаемому исходя из длины области гомологии между ДНК λ и λh^{80} — $8,07 \cdot 10^6$.

Судя по относительной интенсивности флуоресценции окрашенных этидиумбромидом полос в агарозном геле, выход получаемого таким образом фрагмента довольно мал — значительно ниже выхода фрагмента, получаемого при гибридизации ДНК λ и λi^{434} . Этого можно было ожидать, поскольку область гомологии между ДНК λ и λh^{80} довольно мала и, следовательно, вероятность образования гетеродуплексных молекул существенно ниже, чем гомодуплексных. Как и в случае гибридов λ и λi^{434} , фрагмент, соответствующий области гомологии λ и λh^{80} , может быть выделен центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы. Однако в качестве первого этапа выделения мы использовали следующий прием, позволяющий получить значительное обогащение смеси выделяемым фрагментом: смесь после ренатурации, содержащую гомо- и гетеродуплексные молекулы, пропускали через нитроцеллюлозные фильтры, которые, как известно [11], способны к избирательной сорбции одноцепочечных ДНК.

При этом оставшаяся неренатурированная часть ДНК, а также гибридные молекулы, имеющие длинные однонитчатые области, сорбировались на фильтрах, тогда как основная масса гомодуплексных ДНК проходила сквозь них. Фильтры, содержащие сорбированную ДНК, обрабатывали S_1 -нуклеазой. В результате в раствор выделялся двухцепочечный фрагмент, соответствующий области гомологии. По качественным оценкам, основанным на визуальном определении относительной интенсивности флуоресценции окрашенных этидиумбромидом полос после электрофореза в агарозном геле, обогащение смеси в результате такой обработки весьма велико.

Таким образом с помощью обработки различных гетеродуплексных молекул нуклеазой S_1 могут быть выделены фрагменты ДНК фага λ , один из которых содержит все промоторы и операторы ранней транскрипции, а другой — промотор поздней транскрипции. Первый фрагмент, кроме того, содержит целый ряд участков, кодирующих терминацию транскрипции, тогда как во втором их значительно меньше. Иными словами, первый из выделенных фрагментов насыщен регуляторной информацией, второй в этом смысле относительно беден. Несомненный интерес представляет сопоставление общих структурных особенностей этих двух фрагментов.

Экспериментальная часть

Бактериофаги λ cl 857 S_7 , λ i 434 cIts S_7 , λ h 80 cI857 получали тепловой индукцией лизогенов M-65 (λ cI857 S_7 / λ)(Mal $^-$, Gal $^-$)*, W3 102 (λ i 434 cIts S_7 / λ)(Mal $^-$)*, CA 5013 (λ h 80 cI857 sus 91)** соответственно. Меченный тритием бактериофаг λ получали аналогично бактериофагу λ cI857 S_7 , добавляя после индукции в культуральную смесь [3 H]тимидин. Все фаги очищали центрифугированием в ступенчатом градиенте CsCl [12]. Нуклеазу S_1 (КФ 3.1.4.21) выделяли по методу Фогта [13] из такадиастазы, исключая хроматографию на SE-целлюлозе. Рабочий раствор содержал 800 ед. акт./мл [13]. Рестрикционную эндонуклеазу *Eco* RI (КФ 3.1.4.X) выделяли по методу Бойера [14] из *E. coli* Nm 182 (RI), исключая хроматографию на DEAE-целлюлозе.

Получение гетеродуплексов λ — λ i 434 и их расщепление нуклеазой S_1 .

а) Фаги λ и λ i 434 диализовали против 0,01 М Трис-НСI-буфера с 0,001 М EDTA, pH 8,0. К 1,6 мл фага λ (800 мкг ДНК) добавляли 2 мл фага λ i 434 (800 мкг ДНК), 1 мл 1 М NaOH, содержащего 0,2 М EDTA и 5,4 мл H $_2$ O. Смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 1 мл 2 М раствора Трис-основания в 1,8 М HCl и 10 мл формамида (pH полученного раствора 8,5—8,7), снова выдерживали 2 ч при комнатной температуре, охлаждали до 0° и диализовали против холодного 0,01 М Трис-НСI-буфера с 0,001 М EDTA, pH 8,5 (3 смены по 1 л буфера). После диализа раствор концентрировали до содержания ДНК 350—400 мкг/мл, засыпая диализный мешок сефадексом G-200 или декстраном. Обработку S_1 -нуклеазой проводили в смеси, содержащей 0,3 М NaCl, 0,003 М CH $_3$ COONa, 0,001 М ZnSO $_4$ и 5% глицерина, pH 4,6, добавляя к 1 мл сконцентрированного раствора соответствующий буфер и 80 мкл S_1 -нуклеазы. Полученную смесь инкубировали 1 ч при 37°, а затем приливали 50 мкл 1 М Трис-НСI-буфера, pH 8,5.

б) При получении меченого гетеродуплекса λ — λ i 434 для введения максимальной метки фаги λ i 434 и [3 H] λ брали в соотношении 9 : 1, что обеспечивало включение в гетеродуплекс до 90% радиоактивности. Все операции получения гетеродуплекса и его расщепления S_1 -нуклеазой проводили, как описано в пункте «а».

Получение гетеродуплексов λ — λ h 80 и их расщепление нуклеазой S_1 проводили по описанной выше методике. Для расщепления S_1 -нуклеазой

* Из коллекции проф. Пташье (Гарвардский университет, США).

** Из коллекции В. Н. Рыбчина (Политехнический институт, Ленинград).

к 1 мл смеси, содержащей 350—400 мкг ДНК, добавляли соответствующий буфер и 40 мкл S_1 -нуклеазы, инкубировали 1 ч при 37°, а затем добавляли 50 мкл 1 М Трис-НСI-буфера, рН 8,5.

С целью обогащения смеси выделяемым фрагментом 0,5 мл раствора гомо- и гетеродуплексов в 0,6 М NaCl после ренатурации и концентрирования пропускали через нитроцеллюлозный фильтр (AUF5, Chemapol, Чехословакия). Фильтр промывали 10 мл 0,3 М NaCl, помещали в 0,2 мл 0,3 М NaCl с 0,3 М CH_3COONa , 0,001 М $ZnSO_4$ и 5% глицерином, рН 4,6, и добавляли 20 мкл S_1 -нуклеазы. Фильтр инкубировали 1 ч при 37°, раствор собирали, фильтр промывали 0,2 мл 0,001 М Трис-НСI-буфера с 0,001 М EDTA, рН 8,5. Промывной и основной растворы объединяли.

Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в 0,7% геле агарозы (Bio-Rad, США), подвергнутом автоклавированию. Для электрофореза использовали 0,04 М Трис-НСI-буфер с 0,005 М CH_3COONa , 0,001 М EDTA, рН 7,9. Трубки геля (длина 9,5 см, диаметр 5 мм) подвергали префорезу в течение 30 мин при напряжении 50 В. Образцы ДНК в 5% сахарозе наслаивали на трубки под буфер. В качестве маркера использовали бромфеноловый синий. Форез проводили при напряжении 70 В до тех пор, пока краситель не проходил до конца трубки (~ 2,5 ч). Гель прокрашивали 15 мин раствором этидиумбромида (0,5 мкг/мл), просматривали в ультрафиолетовом свете и фотографировали со светочувствительным ОС-12.

Центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы. На 11 мл раствора сахарозы (линейный градиент 5—20%) в 0,01 М Трис-НСI-буфере с 0,2 М NaCl, 0,001 М EDTA, рН 7,4, наслаивали 0,35 мл S_1 -гидролизата гетеродуплекса $[^3H]\lambda - \lambda i^{434}$ с концентрацией 150 мкг/мл (140 000 имп/мкг). Центрифугирование осуществляли на центрифуге L5-50, ротор SW-41 (Beckman, США) в течение 18 ч при 30 000 об/мин. После центрифугирования содержимое пробирки собирали фракциями по 0,4 мл и аликвоты фракций просчитывали в диоксановом сцинтилляторе.

Расщепление ДНК фага λ рестриктазой EcoRI. Для получения рестрикта ДНК фага λ к 1 мкг ДНК добавляли 1 мкл эндонуклеазы Eco RI и 0,1 М Трис-НСI-буфер с 0,005 М $MgCl_2$, 0,05 М NaCl и 0,01 М меркаптоэтанол, рН 7,4. Общий объем смеси 40 мкл. Инкубацию проводили при 37° в течение 2 ч. По окончании инкубации добавляли EDTA до конечной концентрации 0,05 М. Перед нанесением смеси на агарозную трубку рестрикт прогревали 10 мин при 74° и быстро охлаждали, помещая в ледяную воду для диссоциации «липких» концов ДНК.

Выделение фрагмента ДНК λ , содержащего промотор поздней транскрипции, производили из гидролизата гетеродуплексов $\lambda - \lambda i^{434}$, полученного с помощью S_1 -нуклеазы, используя гель-электрофорез. Трубки с гелем прокрашивали этидиумбромидом (0,5 мкг/мл); участки геля, содержащие нужный фрагмент, вырезали и фрагмент ДНК выдавливали из них после замораживания кусочков геля в смеси сухой лед — ацетон и последующего оттаивания [15].

Для удаления красителя и остатков агарозы полученный раствор пропускали через колонку с аминексом 50 W \times 2 (200—325 меш, Na^+ -форма, 2 \times 5 мм), уравновешенную 0,01 М Трис-НСI-буфером с 0,001 М EDTA, рН 8,5. На 1 мкг ДНК брали 5—10 мг ионообменной смолы. После пропускания через колонку к раствору добавляли $1/2$ объема 30% раствора полдиэтиленгликоля с M 6000 (ПЭГ-6000, Мерск, ФРГ) в 1,5 М NaCl, выдерживали 1 ч при 0° и центрифугировали 1 ч при 10 000 об/мин. Осадок растворяли на холоду при встряхивании в 0,01 М Трис-НСI-буфере с 0,001 М EDTA, рН 8,5, и обрабатывали эндонуклеазой EcoRI. Рестрикт наносили на агарозную трубку и проводили электрофорез в условиях, описанных выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salser W. A. (1974) *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 923—965.
2. Сverdlov E. D. (1975) в сб. *Итоги науки и техники, сер. «Молекулярная биология»*, т. 4, с. 7—88, ВИНТИ, М.
3. Shapiro J., Machattie L., Eron L., Ihler G., Ippen K., Beckwith J. (1969) *Nature (London)*, **224**, 768—774.
4. Bartok K., Garon C. F., Berry K. W., Fraser M. J., Rose J. A. (1974) *J. Mol. Biol.*, **87**, 437—450.
5. Shenk T. E., Rhodes C., Rigby P. W. I., Berg P. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 989—993.
6. Lis J. T., Schleif R. (1975) *J. Mol. Biol.*, **95**, 409—416.
7. Szybalski W., Bovre K., Fiandt M., Hayes S., Hradecna Z., Kumar S., Lozeron H. A., Nijkamp H. J. J., Stevens W. F. (1970) *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, v. XXXV, Cold Spring Harbor, L. I., N. Y., pp. 341—353.
8. Fiandt M., Hradecna Z., Lozeron H. A., Szybalski W. (1971) in *The bacteriophage lambda* (Hershey A. D., ed.), pp. 329—354, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
9. Allet B., Jeppesen P. G. N., Katagiri K. J., Delius H. (1973) *Nature*, **241**, 120—123.
10. Thomas M., Davis R. W. (1975) *J. Mol. Biol.*, **91**, 315—328.
11. Gillespie S., Gillespie D. (1971) *Biochem. J.*, **125**, 481—487.
12. Сverdlov E. D., Левитан Т. Л. (1976) *Биоорг. химия*, **2**, 370—374.
13. Vogt V. M. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **33**, 192—200.
14. Greene P. J., Betlach M. C., Boyer H. W., Goodman H. M. (1974) in *Methods in Molecular Biology* (Wickner R. B., ed.), v. 7, pp. 87—111, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
15. Thuring R. W. J., Sanders J. P. M., Borst P. (1975) *Anal. Biochem.*, **66**, 213—220.

Поступила в редакцию
18.VI.1976

FRAGMENTS OF THE PHAGE λ DNA OBTAINED BY TREATMENT OF HETERODUPLEX DNA WITH NUCLEASE S_1

SVERDLOV E. D., MONASTYRSKAYA G. S., BUDOWSKY E. I.,
PETROV N. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Molecular Biology, Novosibirsk*

Using the method of heteroduplex DNA digestion by nuclease S_1 , two fragments of phage λ DNA have been isolated and identified. The literature data on the arrangement of homologous regions in DNA of λ -type phages, which were used to obtain heteroduplexes, substantiate a conclusion that one of the fragments contains promoters and operators of early transcription programmed by phage λ DNA, whereas the other fragment comprises one of the promoters of late transcription.