



УДК 547.963.32.04

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ФРАГМЕНТА ДНК ФАГА λ ,
СОДЕРЖАЩЕГО ПРОМОТОР ПОЗДНЕЙ ТРАНСКРИПЦИИ P_R

Кравченко В. В., Василенко С. Г.

Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР

Гилева И. П., Зайцев Б. Н.

Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

Из комплекса ДНК фага λ CI 857 с РНК-полимеразой *E. coli* после расщепления рестриктазой *Bsu*I выделен фрагмент, имеющий длину 740 пар оснований (*Bsu*-740). Фрагмент *Bsu*-740 локализован на 720 пар оснований влево и на 20 пар оснований вправо от *Eco*RI-сайта, расположенного в точке 93,1% физической карты ДНК фага λ . С помощью электронной микроскопии показано, что место связывания РНК-полимеразы *E. coli* расположено в центре фрагмента. При транскрипции фрагмента *Bsu*-740 *in vitro* образуется самотерминирующаяся 6S РНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что фрагмент *Bsu*-740 содержит промотор поздней транскрипции P_R .

Поздняя стадия развития бактериофага λ включает транскрипцию генов, кодирующих структурные белки фаговой частицы. Такая транскрипция инициируется с промотора P_R , расположенного вблизи правого конца молекулы ДНК фага λ [1, 2]. Промотор P_R интересен в том отношении, что при транскрипции ДНК фага λ *in vitro* РНК-полимеразой *E. coli* с P_R синтезируется самотерминирующаяся 6S РНК [2-4]. Эффект терминации этой РНК не зависит от присутствия фактора терминации ρ [2] в отличие от РНК, синтезирующихся в тех же условиях с других фаговых промоторов [2, 5]. В связи с этим значительный интерес представляло бы выделение фрагмента, содержащего транскриптон 6S РНК, исследование его транскрипционных свойств и установление первичной структуры промоторного и терминаторного участков транскриптона.

В предыдущем сообщении [6] нами было описано выделение шести промоторных фрагментов из *Bsu*I-гидролизата ДНК фага λ CI 857. По предварительным данным [6], один из этих фрагментов содержит промотор P_R . Настоящая работа посвящена более подробной характеристике *Bsu*-фрагмента, содержащего промотор P_R .

При электрофоретическом анализе гидролизатов ДНК фага λ CI 857 шесть связывающих РНК-полимеразу фрагментов (см. рис. 1, дорожки 2 и 4) были идентифицированы нами в предыдущем сообщении [6] и было показано, что фрагмент *bsu*-5 содержит промотор, обеспечивающий правонаправленную транскрипцию, и в пределах этого фрагмента имеется *Eco*RI-сайт, расположенный в точке 93,1% длины генома λ [7]. Сравнение подвижностей фрагмента *bsu*-5 и фрагментов-маркеров (см. «Эксперимен-

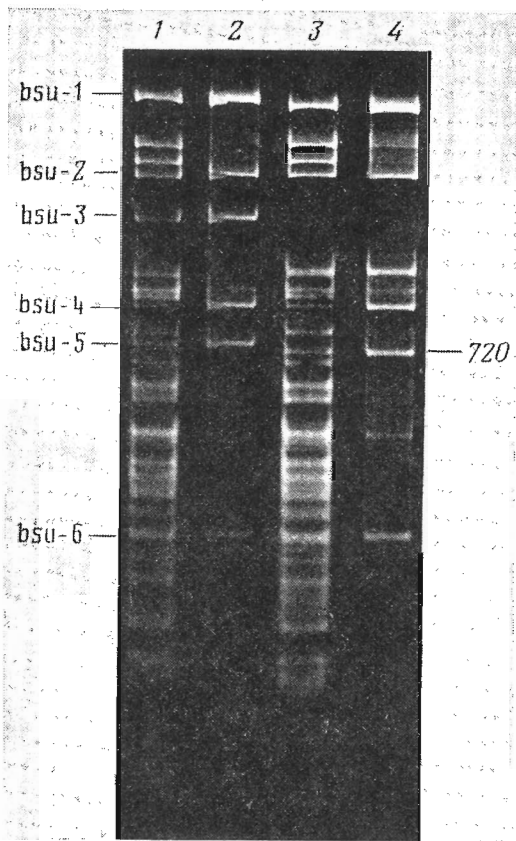


Рис. 1

Рис. 1. Результаты гель-электрофореза *BsuI*- и (*BsuI+EcoRI*)-гидролизатов ДНК λ CI 857 (дорожки 1 и 3) и фрагментов этих гидролизатов, связывающих РНК-полимеразу, выделенных как описано в работе [6] (дорожки 2 и 4). Электрофорез проводили в 3% полиакриламидном геле в буфере: 40 мМ ацетат натрия – 20 мМ трис – 1 мМ EDTA, pH 8,0 (буфер E), в течение 6 ч при 60 В. Фрагменты, содержащие промоторы, указаны [6]. Другие обозначения см. в тексте

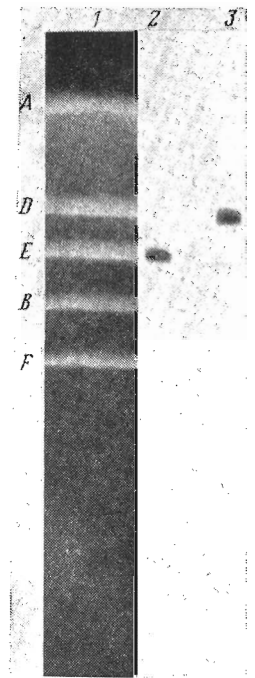


Рис. 2

Рис. 2. Результаты гибридизации транскриптов, образующихся при транскрипции *in vitro* фрагментов *Bsu-740* и *bsu-4*, с иммобилизованными на нитроцеллюлозном фильтре *EcoRI*-фрагментами ДНК λb_2 . 1 – гель-электрофорез в 1% агарозном геле *EcoRI*-гидролизата ДНК λb_2 , использованного для иммобилизации на фильтре по работе [12]; 2 – радиоавтограф транскрипта с фрагмента *Bsu-740*; 3 – то же, что 2, но с *bsu-4*. А, D, E, B, F – обозначения *EcoRI*-фрагментов ДНК λb_2 . Гибридизацию проводили как описано в разделе «Экспериментальная часть»

тальную часть») показало, что он имеет длину 740 пар оснований. Далее мы его называем *Bsu-740*.

Известно, что промотор поздней транскрипции P_R обеспечивает правонаправленную транскрипцию [1] и расположен в районе 92,1–92,9% длины генома λ [4, 8]. Сравнение этих литературных данных о промоторе P_R с нашими данными о промоторе, расположенном во фрагменте *Bsu-740*, позволяет предполагать их идентичность. Однако в ряде работ [8–10] отмечалось, что в ДНК фага λ имеется место связывания РНК-полимеразы *E. coli*, расположенное правее *EcoRI*-сайта 93,1%. Ботчан [11] наблюдал *in vitro* инициацию транскрипции в этом районе на суперскрученной ДНК фага λ . В связи с этим необходимо было выяснить, с какой стороны от *EcoRI*-сайта расположена промоторсодержащая часть фрагмента *Bsu-740*. и окончательно показать, что этот фрагмент содержит промотор P_R .

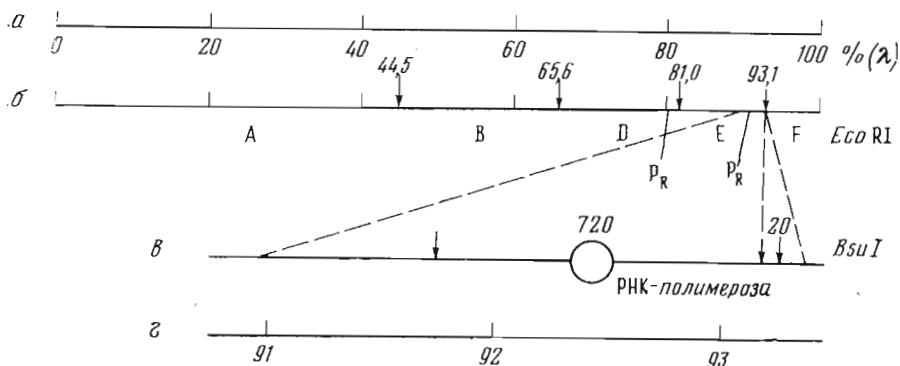


Рис. 3. Локализация фрагментов *Bsu*-740 на физической карте ДНК фага λ : а — масштаб для (б) в процентах полной длины ДНК фага λ ; б — карта расщепления ДНК λb_2 рестриктазой *Eco*RI [7] и положение промоторов P_R [9, 13] и P'_R [4, 8] в ДНК λb_2 ; в — увеличенная область окрестности промотора P'_R и положение фрагмента *Bsu*-740 относительно *Eco*RI-сайта 93,1%; г — масштаб для (в) в процентах полной длины ДНК фага λ . Вертикальными стрелками указаны места расщепления рестриктазами *Eco*RI и *Bsu*I. Место связывания РНК-полимеразы на фрагменте *Bsu*-740 указано на основе данных, приведенных на рис. 4

Как видно на рис. 1 (дорожка 4), промоторсодержащая часть фрагмента *Bsu*-740 при действии на него эндонуклеазы рестрикции *Eco*RI укорачивается на 20 пар оснований. Однако из этих результатов не ясно, с какой стороны от *Eco*RI-сайта лежит промотор, расположенный во фрагменте (*Bsu*I+*Eco*RI)-720.

Для определения расположения этого промотора относительно *Eco*RI-сайта использовали метод РНК-ДНК-гибридизации на фильтрах [12]. При этом РНК, образующуюся при транскрипции фрагмента *Bsu*-740, гибридовали с *Eco*RI-фрагментами ДНК λb_2 , разделенными электрофорезом в 1% агарозном геле и иммобилизованными на нитроцеллюлозном фильтре. В качестве контроля специфичности гибридизации использовали транскрипт с фрагмента *bsu*-4 (см. рис. 1), содержащий промотор P_R [6, 9, 13]. Как видно из рис. 2, транскрипт с фрагмента *Bsu*-740 гибридуется с *Eco*RI-фрагментом Е (см. рис. 3), а транскрипт с фрагмента *bsu*-4 — с D. Следовательно, промотор, содержащийся во фрагменте *Bsu*-740, расположен слева от *Eco*RI-сайта 93,1% (см. рис. 3). Эти данные вместе с результатами предыдущего исследования [6] позволяют заключить, что промотор, расположенный во фрагменте *Bsu*-740, соответствует промотору P'_R .

Для локализации места связывания РНК-полимеразы *E. coli* в пределах фрагмента *Bsu*-740 исследовали связывание РНК-полимеразы с фрагментом методом электронной микроскопии (рис. 4). Как видно из рис. 4, единственное место связывания РНК-полимеразы *E. coli* расположено посередине фрагмента *Bsu*-740. С учетом данных по локализации фрагмента относительно *Eco*RI-сайта (см. рис. 3) можно вычислить, что этот участок связывания РНК-полимеразы расположен в районе 92,4% длины генома (при расчете принимали, что 1% длины ДНК λ составляет 480 пар оснований [8]). Такое расположение места связывания РНК-полимеразы на фрагменте *Bsu*-740 согласуется с локализацией промотора P'_R в районе 92,1–92,9% длины ДНК λ [4, 8].

Из исследований транскрипции ДНК фага λ *in vitro* известно, что с промотора P'_R синтезируется 6S РНК [2–4]. Сравнение количества 6S РНК, образующейся при транскрипции ДНК λ *in vitro* в присутствии и в отсутствие фактора терминации ρ , указывает на то, что терминация этой РНК не зависит от фактора ρ [2–4]. Мы проверили эти данные, используя в качестве матрицы при транскрипции фрагмент *Bsu*-740. Как видно

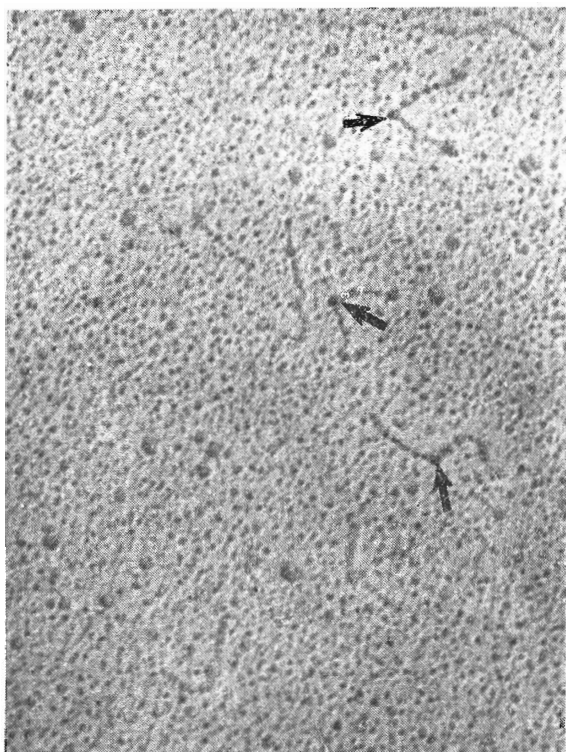


Рис. 4

Рис. 4. Электронно-микроскопическая фотографии комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с фрагментом *Bsu*-740 (указан стрелками). Образцы для электронной микроскопии готовили по [23]

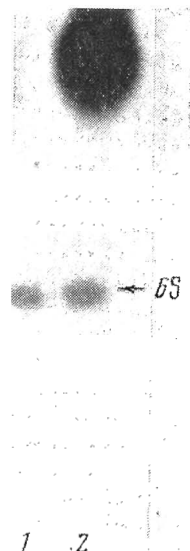


Рис. 5

Рис. 5. Радиоавтограф меченых ^{32}P -транскриптов ДНК фага λ CI 857 (2) и фрагмента *Bsu*-740 (1)

из рис. 5, при транскрипции фрагмента *Bsu*-740 *in vitro* образуется единственная РНК. Подвижность этой РНК соответствует 6S РНК, образующейся при транскрипции ДНК фага λ CI 857 в этих же условиях. Обращает на себя внимание факт самотерминации РНК, синтезирующейся *in vitro* с фрагмента *Bsu*-740 в отсутствие фактора терминации ρ (см. рис. 5). Это обстоятельство позволяет заключить, что эффект терминации 6S РНК обусловлен только особенностями первичной структуры транскрипта 6S РНК.

Экспериментальная часть

ДНК из фагов λ CI 857 и λb_2 выделяли двойной фенольной экстракцией фагов, которые выращивали и очищали как описано в работе [14]. Конечный препарат ДНК диализовали против буфера TE (10 мМ трис-НСI, рН 8,0—0,5 мМ EDTA), определяли концентрацию по поглощению при 260 нм (1 ед. D_{260} соответствует 50 мкг) и хранили при 4°С. Эндонуклеазы рестрикции из *H. influenzae* (HindI+III), *E. coli* NM182 (*Eco*RI) и *B. subtilis* (*Bsu*I) выделяли известными методами (соответственно [15, 7, 16]). РНК-полимераза *E. coli* MRE-600 была любезно предоставлена Е. Ф. Зайчиковым (НИОХ СО АН СССР), она была выделена комбинацией методов [17, 18], имела активность 2500 ед./мг по [18] и содержала, по данным электрофореза в буфере с додецилсульфатом натрия, стехиометрическое количество σ -субъединицы.

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции *BsuI* и *EcoRI* и выделение промоторных фрагментов проводили как описано нами ранее [6].

Длины фрагментов определяли совместным гель-электрофорезом с гидролизатами ДНК фагов λ CI 857 и T7 (любезно предоставлена Е. Ф. Зайчиковым), полученными действием эндонуклеаз рестрикции *HindIII*; длины фрагментов-маркеров установлены в работах [19, 20]. Электрофорез проводили в 1,6% агарозном и 3% полиакриламидном гелях, приготовленных в аппарате Студиера [21]. Окраску и фотографирование гелей осуществляли как описано в [6]. При выделении фрагментов из геля использовали метод электроолиции [22]. Для приготовления гелей использовали агарозу, акриламид и N,N' -метиленабисакриламид производства Bio-Rad (США).

Для получения транскриптов 1 пмоль фрагмента или ДНК λ CI 857 в буфере А (10 мМ трис-НСl, рН 8,0; 10 мМ $MgCl_2$; 5 мМ 2-меркаптоэтанол; 50 мМ NaCl) инкубировали 10 мин при 37° С с 1 или 10 мкг (в случае ДНК) РНК-полимеразы и затем последовательно добавляли гепарин (40 мкг/мл) и смесь четырех рибонуклеозид-5'-трифосфатов (α - ^{32}P)CTP, Amersham) до концентрации 10^{-4} М (конечный объем 20 мкл в случае фрагмента и 200 мкл в случае ДНК). После 30 мин инкубации этой смеси при 37° С реакцию останавливали добавлением EDTA до концентрации 0,02 М и додецилсульфат натрия до 0,5%, РНК экстрагировали фенолом, насыщенным 0,1 М ацетатом натрия, рН 5,5, и осаждали спиртом. Полученные РНК анализировали электрофорезом в 6% полиакриламидном геле, приготовленном на 0,09 М трис-боратном буфере, рН 8,2, с 7 М мочевиной. Положение полос РНК на геле определяли радиоавтографией, используя пленку РТ-1 Казанского химзавода им. В. В. Куйбышева. При определении длин РНК в качестве маркеров использовали 23S, 16S и 5S рибосомные РНК. Положение рибосомных РНК на геле выявляли после окрашивания этидиумбромидом (1 ч в растворе 5 мкг/мл) по флуоресценции в проходящем УФ-свете.

Фрагменты ДНК λb_2 (50 мкг) после расщепления эндонуклеазой рестрикции *EcoRI* разделяли в 1% агарозном геле (0,4×5×16 см), денатурировали 0,1 н. щелочью, нейтрализовали в растворе 1 М трис-НСl, рН 7,0, с 0,9 М NaCl и переносили на нитроцеллюлозный фильтр HAWP (Millipore, США) как описано в [12]. Полоску фильтра (ширина 0,5 см) помещали в буфер 2×SSC (1×SSC: 0,15 М NaCl — 0,015 М цитрат натрия), добавляли 10 000 имп/мин транскрипта и инкубировали 10–12 ч при 65° С. По окончании гибридизации фильтр промывали в свежем буфере 2×SSC (три раза по 30 мин при 55° С), помещали в буфер 1×SSC, обрабатывали смесью РНКаз А и T₁ (40 мкг/мл и 20 ед./мл соответственно) 1 ч при 20° С, ополаскивали в большом объеме буфера 1×SSC (20–30 мл), сушили и радиоавтографировали.

Образцы комплекса фрагмента *Bsu*-740 с РНК-полимеразой *E. coli* для электронной микроскопии готовили по [23]. Анализ таких комплексов осуществляли с помощью электронного микроскопа EM-100с (Япония).

Авторы благодарят Е. Ф. Зайчикову за предоставление препаратов РНК-полимеразы и ДНК фага T7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Herskowitz I., Signer E. (1970) J. Mol. Biol., 47, 545–556.
2. Roberts J. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3300–3304.
3. Lebowitz P., Weissman S., Radding C. M. (1971) J. Biol. Chem., 246, 5120–5139.
4. Sklar J., Yot P., Weissman S. M. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1817–1821.
5. Свердлов Е. Д., Монастырская Г. С., Росташов В. М. (1978) Биоорганической химии, 4, 894–900.
6. Василенко С. К., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В. (1978) Докл. АН СССР, 241, 710–713.
7. Thomas M., Davis R. (1975) J. Mol. Biol., 91, 315–328.

8. Vollenweiger H. J., Szybalski W. (1978) *J. Mol. Biol.*, **123**, 485-498.
9. Allet B., Solem R. (1974) *J. Mol. Biol.*, **85**, 475-484.
10. Jones B. B., Chan H., Rothstein S., Wells S., Reznikoff W. S. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4914-4918.
11. Botchan P. (1976) *J. Mol. Biol.*, **105**, 161-176.
12. Southern E. M. (1975) *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
13. Streeck R. E., Hobom G. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **57**, 595-606.
14. Wu R., Radmanabhan R., Bambaru R. (1974) in: *Methods in Enzymology*, vol. 29E, pp. 231-254, Acad. Press, N. Y.
15. Smith H., Wicox K. (1970) *J. Mol. Biol.*, **51**, 379-391.
16. Bron S., Murray K., Trautner T. A. (1975) *Mol. Gen. Genet.*, **143**, 13-23.
17. Burgess R. R., Jendrisak J. J. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4634-4638.
18. Gonzales N., Wiggs J., Chamberlin M. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **182**, 404-408.
19. Robinson L. H., Landy A. (1977) *Gene*, **2**, 1-31.
20. Gordon R. L., Humphries P., McConell D. J. (1978) *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 329-339.
21. Studier F. W. (1972) *J. Mol. Biol.*, **79**, 237-248.
22. McDonell M. W., Simon M. N., Studier F. W. (1977) *J. Mol. Biol.*, **110**, 119-146.
23. Александров А. А., Черный Д. Н. (1976) *Докл. АН СССР*, **231**, 471-473.

Поступила в редакцию
12.VI.1979

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHAGE λ DNA FRAGMENT CONTAINING THE PROMOTER P'_R

KRAVCHENKO V. V., VASSILENKO S. K., GILEVA I. P., ZAITSEV B. N.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk: Special Bureau for
Design and Technology of Biologically Active Compounds, Novosibirsk*

The fragment of 740 base pairs (*Bsu*-740) has been isolated from the complex of phage λ CI 857 DNA with RNA-polymerase after cleavage with restriction endonuclease *Bsu*I. The fragment *Bsu*-740 is localized at 720 b.p. to the left and at 20 b.p. to the right from the point 93.1% of the physical map of phage DNA. The electron microscopic studies have shown that RNA-polymerase binding site is situated in the middle of this fragment. On transcription of the *Bsu*-740 in vitro the synthesis of only 6S RNA takes place. The data obtained indicate that the fragment *Bsu*-740 contains the promoter of the late transcription P'_R and all other signals needed for production of the 6S RNA.