



УДК 576.858.9+547.963.32.02:577.155.2.08

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДНК
ФАГОВ λ att80, λ att80rif^a35 И λ rif^a47

Гуревич А. И., Аваков А. Э., Биселева О. А.

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

Данилевская О. Н., Ковалев Ю. Н.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

В ДНК гибридного фага λ att80 и трансдуцирующих фагов λ rif^a47 и λ att80rif^a35 установлено расположение сайтов действия рестриктаз *Eco*RI и *Hind*III. Путем сопоставления полученных рестриктазных карт, а также рестриктазной карты трансдуцирующего фага λ rif^a18 показано размещение в изученных фагах участков ДНК λ , ДНК \varnothing 80 и бактериальной ДНК *E. coli*. Определено положение в локусе *bfe* двух вторичных сайтов интеграции λ и примерное положение в этом локусе вторичного сайта интеграции \varnothing 80.

Вторичные сайты интеграции фагов λ и \varnothing 80 в хромосому *E. coli* находятся в локусе *bfe*, расположенном на 88,5 мин генетической карты вблизи группы генов *rrn*, *rpl* и *rpo*. Это позволяет получать на основе фагов λ и \varnothing 80 различные трансдуцирующие фаги, включающие участки бактериальной ДНК *E. coli* с указанными генами и частью локуса *bfe*. В одном из таких трансдуцирующих фагов, λ rif^a18, содержится целиком оперон *rpo*BC (определяющий синтез β - и β' -белков РНК-полимеразы) [1], наиболее удаленный от локуса *bfe* из перечисленных выше генов. Ранее мы описали другой трансдуцирующий фаг, λ rif^a47, в котором оперон *rpo*BC содержится не полностью [2, 3]. Еще один трансдуцирующий фаг, λ att80rif^a35, созданный на основе гибридного фага λ att80 (содержащего участок *att* из ДНК фага \varnothing 80) [4, 5], содержит подобно λ rif^a18 весь оперон *rpo*BC. Интересно было провести сравнительное изучение ДНК этих трансдуцирующих фагов для более детальной характеристики района интеграции фагов λ и \varnothing 80 в локусе *bfe*. С этой целью мы сопоставили расположение в хромосомах трансдуцирующих фагов сайтов действия рестриктаз *Eco*RI и *Hind*III.

Для обнаружения фрагментов, образовавшихся при действии рестриктаз, либо только тех из них, которые являются концевыми в ДНК фагов, мы использовали избирательное введение радиоактивной ³²P-метки в выступающие однонитевые концы фрагментов с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* и [α -³²P]дезоксинуклеозидтрифосфатов, как это описано нами ранее [3]. Величины фрагментов были определены по их электрофоретической подвижности в 1 и 0,5% агарозном геле, а их число — по интенсивности флуоресценции соответствующих зон в гелях, прокрашенных раствором бромистого этидия (таблица).

Величина рестриктных фрагментов ДНК λ , $\lambda att80$, $\lambda att80rif^{d35}$ и λrif^{d47} (в кпн), полученных при действии рестриктаз *EcoRI* и *HindIII*

λ				$\lambda att80$		$\lambda att80rif^{d35}$			λrif^{d47}	
<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI/HindIII</i>	<i>HindIII/EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI/HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>
20,75 *	22,4 *	20,75	20,75	20,75 *	22,4 *					
				15,0			13,5 *			
							12,7			12,7
					11,2	11,4				12,2 *
	9,0					8,65	8,7	8,7	8,65	11,95
7,15									8,65	
	6,4				6,4		6,4		7,15	
				5,65		5,8 *		5,8		6,4
5,65						5,65			5,65	
5,25		5,0	5,0						5,1	
4,5		4,85	4,85					4,85	4,5 *	
	4,4 *				4,4 *		4,4 *			4,4 *
		4,0	4,0							
3,6 *		3,6	3,6	3,6 *		3,6 *		3,6	3,6 *	
						2,8		2,8	2,8	
									2,4	
									2,3	
									2,3	
	2,2								2,05	
	1,9								2,05	
		1,7	1,7							
		1,55	1,55						1,75	
		1,25	1,25						1,55	
		0,9	0,9			1,2			1,2	
		0,8	0,8			1,1			1,1	
		0,8	0,8						0,8	
	0,6		0,6		0,6		0,6	0,6	0,6	0,6
								0,55		
							0,3	2,0,3		0,3
46,9	46,9	44,4 (+2,5)	46,9	45,0	45,0	46,6	46,6	46,6	48,55	48,55

* Концевые фрагменты.

Для большей достоверности расположения сайтов действия *EcoRI* и *HindIII*, а также для идентификации фрагментов одинакового размера, образующихся из ДНК разных фагов, использовали последовательную обработку обеими рестриктазами. В таблице приведены размеры фрагментов (в кпн *) *EcoRI/HindIII*, обнаруженные после действия *EcoRI* и введения радиоактивной метки с последующим расщеплением *HindIII*, либо фрагментов *HindIII/EcoRI*, обнаруженных после действия *HindIII* и введения метки с последующим расщеплением *EcoRI*. При этом фрагменты, не подвергшиеся расщеплению второй рестриктазой, обладали вдвое большей радиоактивностью, чем расщепленные, а фрагменты, не содержащие радиоактивной метки, не обнаруживались. Составленные на основе полученных таким образом данных рестриктазные карты приведены на рис. 1. На этом рисунке *EcoRI*-фрагменты ДНК λ обозначены, как и ранее [7], в порядке их расположения с левого конца; буквенные обозначения фрагментов остальных ДНК приведены в порядке возрастания их электрофоретической подвижности.

Полученная нами рестриктазная карта ДНК λ , служившего исходным фагом при создании трансдуцирующих фагов λrif^{d47} и λrif^{d18} , отличается

* кпн — число нуклеотидных пар в тысячах.

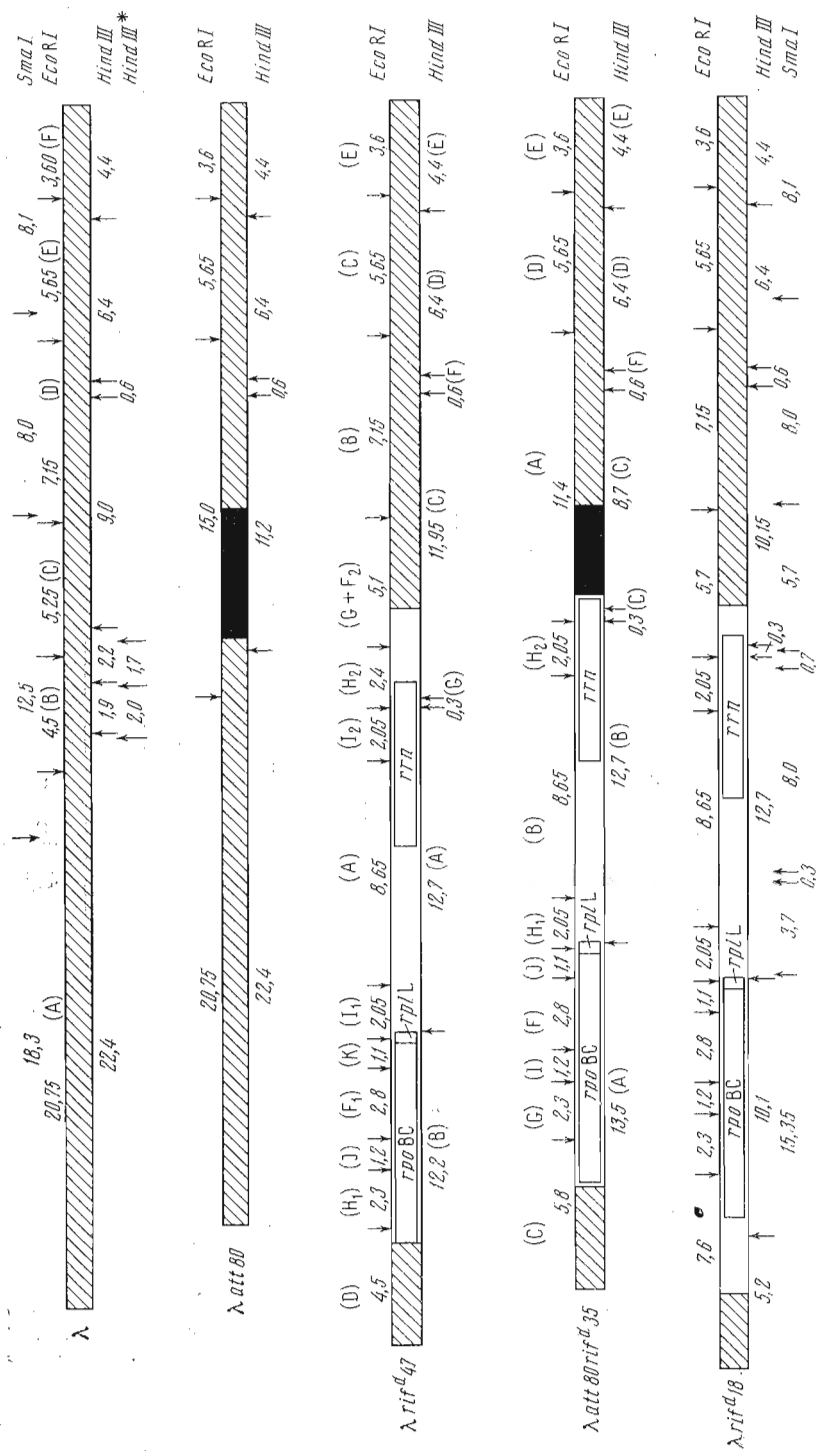


Рис. 1. Схема распределения ДНК фагов λ , $\lambda att 80$, λrif^{47} , $\lambda att 80 rif^{35}$ и λrif^{18} рестрикциями *EcoRI*, *HindIII* и *SmaI*. Расстояние между сайтами действия рестриктаз в ДНК λrif^{18} и отмеченные звездочкой данные по действию *HindIII* на ДНК λ приведены в соответствии с работами [1, 6]. Величины фрагментов приведены в кпн. Величина *EcoRI*-фрагмента F ДНК λ приведена в соответствии с данными работы [3]. Собственная ДНК λ заштрихована, ДНК λ заштрихована, ДНК *E. coli* оставлена светлой. В трансдуцирующих фагах указано положение бактериальных генов *rif^r*, *rpi* и *gro*

от приведенной в работе [1] лишь небольшим изменением положения трех левых сайтов действия рестриктазы *HindIII* (см. рис. 1).

ДНК фага λ att80, на основе которого получен трансдуцирующий фаг λ att80rif^d35, расщепляется рестриктазой *EcoRI* на 4 фрагмента (20,75; 15,0; 5,65 и 3,6 кнп), из которых концевыми являются наибольший и наименьший фрагменты. Эти концевые фрагменты и фрагмент 5,65 кнп совпадают с соответствующими фрагментами ДНК λ ; величина же 4-го фрагмента ДНК λ att80 (15,0 кнп) меньше суммы остальных трех *EcoRI*-фрагментов ДНК λ . Отсюда следует, что в гибридном фаге делегированная часть ДНК λ больше вставки ДНК ϕ 80, а также больше *EcoRI*-фрагмента С (5,25 кнп), в результате чего отсутствуют 2 сайта узнавания рестриктазой *EcoRI*. Рестриктаза *HindIII* расщепляет ДНК λ att80 на 5 фрагментов, из которых концевые (22,4 и 4,4 кнп) и еще 2 (6,4 и 0,6 кнп) совпадают с 4 фрагментами ДНК λ , а последний (11,2 кнп) меньше суммы трех остальных *HindIII*-фрагментов ДНК λ (9,0; 2,2 и 1,9 кнп) на 1,9 кнп. Эта величина равна разнице между делегированной частью ДНК λ и вставкой ДНК ϕ 80. Левая граница этой вставки должна находиться в пределах 22,4 и 24,3 кнп от левого конца ДНК λ att80 или, точнее, в участке гомологии родителевских фагов λ и ϕ 80 в области b2 [8], т. е. между 23,2–23,5 кнп от левого конца ДНК λ att80 (см. рис. 1). Правая граница вставки ДНК ϕ 80 должна находиться не далее 16,4 кнп от правого конца ДНК (см. рис. 1) или, с учетом положения участка строгой гомологии λ и ϕ 80 в области генов *red* [8], между 16,0 и 16,4 кнп от правого конца ДНК. Вытекающий из этих данных вывод о величине ДНК λ att80 (45,0 кнп) согласуется с низкой плавающей плотностью частиц этого фага ($d_{1,4957}$ г/мл).

Изображенная на рис. 1 *EcoRI*-эндонуклеазная карта ДНК λ rif^d47 отличается от составленной ранее [3] размером *EcoRI*-фрагмента Н₂ (2,4 вместо 2,3 кнп) и отсутствием дополнительного сайта в пределах *EcoRI*-фрагмента G+F₂. Ошибка в предыдущей работе была связана с тем, что причиной увеличенной радиоактивности зон *EcoRI*-фрагментов Н₁ и F считали присутствие в смеси фрагментов того же размера (2,3 и 2,8 кнп), образовавшихся при расщеплении фрагмента G+F₂ (5,1 кнп), а целый фрагмент G+F₂ принимали за продукт неполного гидролиза. В то же время для опытов по гибридизации с рФНК была использована трудно разделяемая смесь фрагментов Н₁ и Н₂ (2,3 и 2,4 кнп). Исправление *EcoRI*-эндонуклеазной карты сделано на основании проверки числа фрагментов ДНК λ rif^d47 по результатам сканирования интенсивности флуоресценции зон в геле, прокрашенном бромистым этидием. Оказалось, что в смеси *EcoRI*-фрагментов ДНК трансдуцирующего фага λ rif^d47 и фага-помощника λ только фрагменты размерами 7,15; 5,65; 3,6 и 2,05 кнп образуют зоны с двойным количеством ДНК, а остальные фрагменты представлены каждый одной копией. Исправленная карта ДНК λ rif^d47 хорошо согласуется с размерами фрагментов, образующихся при ее расщеплении эндонуклеазой *HindIII*.

При действии эндонуклеазы *EcoRI* на ДНК λ att80rif^d35 образуется 11 фрагментов, из которых 9 совпадают по величине с соответствующими фрагментами ДНК λ rif^d47. Остальные 2 *EcoRI*-фрагмента λ att80rif^d35 представляют собой концевой фрагмент С (5,8 кнп), который больше левого концевого *EcoRI*-фрагмента D λ rif^d47 (4,5 кнп), и наибольший фрагмент А (11,4 кнп), который существенно меньше суммы остальных 3 *EcoRI*-фрагментов λ rif^d47 (2,4; 5,1 и 7,15 кнп).

Следует отметить, что плавающая плотность фага λ att80rif^d35 не отличается от плавающей плотности фага λ , что свидетельствует о примерно одинаковом размере ДНК обоих фагов. С другой стороны, при действии эндонуклеазы *HindIII* на ДНК λ att80rif^d35 образуется 6 фрагментов, размеры которых указаны на рис. 1. Расположение сайтов действия *EcoRI*

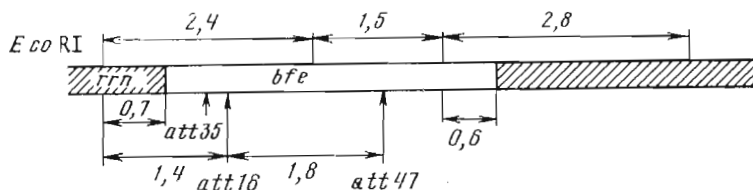


Рис. 2. Расположение вторичных сайтов интеграции фагов λ и $\phi 80$, приводящих к образованию λrif^{d18} (*att18*), λrif^{d47} (*att47*) или $\lambda att80rif^{d35}$ (*att35*) в локусе *bfe* и сайтов действия рестриктазы *EcoRI* в соответствующем участке хромосомы *E. coli* (расстояния приведены в кпп)

и *HindIII* в этой ДНК подтверждают также размеры фрагментов, образующихся при последовательном действии обеих рестриктаз.

Сопоставление рестриктазных карт бактериальной части генома с примыкающими районами фаговых генов в трансдуцирующих фагах λrif^{d47} и $\lambda att80rif^{d35}$, а также описанной в литературе рестриктазной карты трансдуцирующего фага λrif^{d18} [6] позволяет сделать следующие выводы.

Справа от гена *rrn* в ДНК всех 3 трансдуцирующих фагов содержатся участки локуса *bfe* различного размера. Границы локуса *bfe* в хромосоме *E. coli* и расположения в нем 2 сайтов действия эндонуклеазы *EcoRI* были установлены ранее при исследовании ДНК трансдуцирующих фагов $\lambda darg$ [9, 10]. Расстояние между правым сайтом *EcoRI* в гене *rrn* и левым сайтом в локусе *bfe* должно соответствовать размеру *EcoRI*-фрагмента H_2 ДНК λrif^{d47} (2,4 кпп). Это означает, что при образовании λrif^{d47} используется сайт интеграции фага λ , находящийся в локусе *bfe* правее левого сайта *EcoRI* (рис. 2). В то же время, по данным работы [11], при образовании λrif^{d18} используется другой сайт интеграции фага λ , находящийся на расстоянии 1,4 кпп от правого сайта *EcoRI* в гене *rrn* или на расстоянии $\sim 0,7$ кпп от границы локуса *bfe*. Расстояние между 2 сайтами интеграции фага λ в локусе *bfe*, очевидно, равно разности между суммарной длиной *EcoRI*-фрагментов H_2 и $G+F_2$ ДНК λrif^{d47} (2,4+5,1 кпп) и длиной центрального *EcoRI*-фрагмента ДНК λrif^{d18} (5,7 кпп), т. е. составляет 1,8 кпп. Положение *att*-сайта фага $\lambda att80rif^{d35}$ в локусе *bfe* можно рассчитать, исходя из известного расстояния между областью *red* и сайтом *att* фага $\phi 80$. Расчет показывает, что сайт *att35* находится вблизи сайта *att18* и, по-видимому, еще ближе к левой границе локуса *bfe*.

Левый участок бактериальной ДНК всех 3 трансдуцирующих фагов содержит оперон *proBC*. Ранее было показано [1], что этот оперон содержится также в наибольшем *SmaI*-фрагменте ДНК λrif^{d18} наряду с геном рибосомного белка L7 (L12), *rplL*, и что расстояние соответствующего сайта рестриктазы *SmaI* до ближайшего сайта *HindIII* очень мало. В этом *SmaI*-фрагменте ДНК λrif^{d18} имеется еще 1 сайт рестриктазы *HindIII*, расположенный на расстоянии 2,3 кпп слева от самого левого сайта *EcoRI*. При сравнении ДНК 2 других трансдуцирующих фагов видно (см. рис. 1), что этот сайт рестриктазы *HindIII* в них отсутствует. Следовательно, в коцевом *EcoRI*-фрагменте ДНК $\lambda att80rif^{d35}$, который короче коцевого *EcoRI*-фрагмента ДНК λrif^{d18} на 1,8 кпп, содержится менее 2,3 кпп бактериальной ДНК. В этом участке бактериальной ДНК заключена часть оперона *proBC*, отсутствующая в ДНК λrif^{d47} . Соответствующий коцевой *EcoRI*-фрагмент ДНК λrif^{d47} еще короче (на 1,3 кпп), и в нем, судя по результатам гетеродуплексного анализа, проведенного В. Б. Федосеевой, содержится ~ 4 кпп собственной ДНК λ . Из этих данных вытекает, что конец оперона *proBC* расположен в ДНК изученных трансдуцирующих фагов на расстоянии 1,3–2,3 кпп от самого левого сайта *EcoRI*, а его

начало находится в ДНК λrif^{d47} и $\lambda att80rif^{d35}$ в пределах концевых *Hind*III-фрагментов (соответственно фрагментов В и А).

Расположение в ДНК λrif^{d18} сайтов рестриктазы *Sma*I таково [1], что следует ожидать расщепления этой рестриктазой всех *Eco*RI-фрагментов ДНК λrif^{d47} , кроме правого концевого и расположенных в пределах фрагмента *Hind*III-В, т. е. охватывающих область оперона *proBC* (см. рис. 1). Это обстоятельство мы использовали при конструировании химерных плазмид, содержащих *Eco*RI-фрагменты F₁, H₁, J и K, описанных в следующем сообщении*. В то же время для препаративного выделения целого фрагмента *Hind*III-В мы также применили предварительное расщепление рестриктазой *Sma*I. При этом два других, близких по размеру фрагмента (*Hind*III-А и *Hind*III-С) подвергались расщеплению (см. рис. 1) и могли быть легко отделены. Кроме того, обработка двумя рестриктазами, *Sma*I и *Hind*III, приводила к образованию мелких фрагментов из большей части ДНК фага λ , используемого в качестве фага-помощника и трудно отделимого от фага λrif^{d47} . Фрагмент *Hind*III-В, выделенный после такой обработки с помощью гель-электрофореза, был затем использован при составлении более детальной рестриктазной карты.

Авторы выражают благодарность В. И. Тапаяшину (ИБФМ АН СССР) и П. М. Чумакову (ИМБ АН СССР) за предоставление штаммов-продуцентов рестриктаз, И. М. Грубер (НИИВС им. Мечникова) за выращивание микроорганизмов рода *Haemophilus*, Ж. М. Горленко (ИМГ АН СССР) за выделение ДНК фагов $\lambda att80$ и $\lambda att80rif^{d35}$, А. С. Боровику (ИМГ АН СССР) за измерение интенсивности флуоресценции гелей и В. Б. Федосевой (ИМГ АН СССР) за гетеродуплексный анализ ДНК λrif^{d47} .

Экспериментальная часть

Штаммы *Serratia marcescens* и *Haemophilus parainfluenzae* получены от В. И. Тапаяшина (ИБФМ АН СССР, Пуццано), *Haemophilus influenzae Rd* и *Haemophilus aegypticus* — от П. М. Чумакова (ИМБ АН СССР). Выращивание микроорганизмов рода *Haemophilus* проводила И. М. Грубер (НИИВС им. Мечникова, Москва). ДНК фагов $\lambda att80$ и $\lambda att80rif^{d35}$ получены от Ж. М. Горленко (ИМГ АН СССР).

Буферные растворы: А — 10 мМ трис-НСl, 10 мМ β -меркаптоэтанол, рН 7,9; В — 10 мМ К-фосфат, 1 мМ EDTA, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,015% тритон X-100, рН 7,0; В — аналогичен В, рН 7,8; Г — аналогичен В, в 50% глицерине; Д — 10 мМ трис-НСl, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 1 мМ NaCl, рН 7,9; Е — 10 мМ К-фосфат, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 0,1 мМ EDTA, 10% глицерина, рН 7,4; Ж — аналогичен Е, в 50% глицерине; З — 10 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, рН 7,6; И — 90 мМ трис-борат, 2,5 мМ EDTA, рН 8,3; К — 0,9 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, рН 7,4; Л — 0,1 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ β -меркаптоэтанол, рН 1,6; М — 0,2 мМ трис-НСl, 0,1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ β -меркаптоэтанол, рН 7,5; Н — 50 мМ TEAB, рН 8,0; О — 30 мМ трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β -меркаптоэтанол, рН 9,0.

Реактивы и сорбенты: трис (Reanal, Венгрия); тритон X-100, сахараза и EDTA (Serva, ФРГ); оксиапатит (биогель НТР), агароза и биогель А (Bio-Rad, США); [α -³²P]dNTP (150–250 Ки/ммоль, Amersham, Англия); dNTP и дитиотреит (Calbiochem, США); DEAE-целлюлоза DE-52 и фосфоцеллюлоза P-11 (Whatman, Англия). Суммарную тРНК (Boehringer, ФРГ) перед употреблением растворяли в буфере З, трижды экстрагировали фенолом, насыщенным тем же буфером, к водному слою прибавляли двойной объем спирта, вывавшую тРНК отделяли центрифугированием и дважды переосаждали из воды двойным объемом спирта; 1% водный раствор очищенной таким образом суммарной тРНК хранили при –20° С. АГМА-био-

* См. стр. 1205 в этом же номере.

гель* А 1,5м готовили из биогеля А 1,5м путем цианирования ВгСN по методу [15] и последующей обработки гексаметилендиамином по методу [16].

Ферменты. Рестрикционные эндонуклеазы (КФ 3.1.4.32): *EcoRI* выделена из *E. coli* по методу [12]; *SmaI*, *HindII*, *HindIII*, *HpaI*, *HpaII* и *HaeIII* выделены из микроорганизмов-продуцентов по неопубликованным рекомендациям Р. Дж. Робертса с некоторыми уточнениями методик; клетки микроорганизмов при 0–4° С разрушали ультразвуком в буфере А, центрифугировали 2 ч при 100 000g, супернатант обрабатывали раствором сульфата стрептомицина (до 2%) (*SmaI* — в присутствии 70 мкг/мл фенилметилсульфонилфторида) и затем высаливали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. *SmaI* выделяли далее из фракции белков, выпадающих в 2,0–3,3 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, путем хроматографии на DEAE-целлюлозе DE-52 (градиент концентрации (0–0,5 М) КСl в буфере В, активные фракции — в 0,14–0,22 М КСl) и затем на фосфоцеллюлозе P-11 (градиент концентрации (0–1,0 М) NaCl в буфере В, активные фракции — в 0,40–0,55 М NaCl), диализовали против буфера В, затем против буфера Г и хранили при –20° С. *HindII* выделяли из фракции белков, выпадающих в 2,0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, путем хроматографии на биогеле А 0,5м в буфере Д (активные фракции — в 1,5–3 исключенного объема колонки) и затем на DEAE-целлюлозе DE-52 (градиент концентрации (0–0,3 М) КСl в буфере Е, активные фракции — в 0,12–0,25 М КСl), диализовали против буфера Ж и хранили при –20° С. *HindIII* выделяли из фракции белков, выпадающих в 2,0–2,9 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, путем хроматографии на биогеле А 0,5м в буфере Д (активные фракции — в 1,2–1,6 исключенного объема колонки) и затем на DEAE-целлюлозе DE-52 в буфере Е (активная фракция в этом буфере не задерживается катионитом), диализовали против буфера Ж и хранили при –20° С. *HpaI* и *HpaII* выделяли из фракции белков, выпадающих при концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 2,2 М, путем хроматографии на фосфоцеллюлозе P-11 (ступенчатая элюция растворами КСl (0–0,2–0,4–0,6 М) в буфере Е, активные фракции *HpaI* в 0,4 М КСl, *HpaII* — в 0,6 М КСl), *HpaI* дополнительно очищали хроматографией на АГМА-биогеле А 1,5м (градиент концентрации (0,2–0,8 М) NaCl в буфере Е, активные фракции — в 0,5–0,6 М NaCl), диализовали против буфера Е, затем против буфера Ж и хранили при –20° С. Для выделения *HaeIII* раствор до высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ подвергали хроматографии на биогеле А 0,5м в буфере Д, затем к активным фракциям (выходящим в 1,2–1,7 исключенного объема колонки) прибавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 2,3 М и выпавшую фракцию белков хроматографировали на фосфоцеллюлозе P-11 (градиент концентрации (0–1,0 М) КСl в буфере Е, активные фракции — в 0,3–0,7 М КСl), диализовали против буфера Ж и хранили при –20° С. За единицу активности рестриктаз принимали количество фермента, расщепляющее 1 пмоль фосфодиэфирной связи в ДНК за 1 мин при 37° С (*SmaI* — при 30° С). ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7) выделена из *E. coli* В по методу [13] и действием субтилизина превращена в полимеразу Кленова по методу [14].

Малые количества ДНК осаждали из их растворов в присутствии тРНК-носителя. Для этого к раствору (от 50 мкл до 1 мл) прибавляли 5 мкл 1% раствора суммарной тРНК, $\frac{1}{10}$ объема 3 М АсОНa и двойной объем спирта, замораживали при –70° С, оттаивали, центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин, осадок суспендировали в 0,2–1,0 мл спирта, снова центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и высушивали в вакууме.

Электрофорез радиоактивных ДНК в 0,5 и 1% агарозном геле проводили в пластинах (400×200×1 мм) в буфере И и радиоавтографы получали на рентгеновской пленке Kodak XR-5. Перед нанесением на гель к образцу прибавляли 10% по объему 50% раствора сахарозы в 10 мМ EDTA, содержащего по 0,02% маркерных красителей — бромфенолового синего и

* АГМА-биогель — аминоксаметиленаминобиогель.

ксиленцианола *FF*. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на скаширующем флуориметре конструкции А. С. Боровика (ИМГ АН СССР), используя электрофорез в столбиках 1% агарозного геля (140××6 мм), прокрашивание — раствором бромистого этидия (1 мг/л); возбуждающее излучение с λ 300–400 нм, измерение флуоресценции с $\lambda_{\text{макс}}$ 590 нм.

Определение размеров EcoRI- и HindIII-фрагментов ДНК λ , λ att80, λ att80rif^d35 и λ rif^d47. К раствору 3 мкг (0,1 пмоль) ДНК λ , λ att80, λ att80rif^d35 или λ rif^d47, меченных по «липким» концам, как описано в работе [3], в 50 мкл воды прибавляли 6 мкл буфера *K* и 1 мкл (0,01 ед. акт.) раствора рестриктазы *EcoRI* или 6 мкл буфера *L* и 3 мкл (0,01 ед. акт.) раствора рестриктазы *HindIII*, инкубировали 1 ч при 37° С и подвергали электрофорезу в пластине агарозного геля рядом с эталонным набором *EcoRI*-фрагментов ДНК λ rif^d47. Найденные величины концевых фрагментов приведены в таблице и на рис. 1.

3 мкг ДНК λ , λ att80, λ att80rif^d35 или λ rif^d47 расщепляли рестриктазой *EcoRI* или *HindIII*, полученные наборы фрагментов осаждали с тРНК-носителем, растворяли в 30 мкл воды, прибавляли 20 мкл буфера *M*, по 5 мкл 5 мМ растворов dGTP, dCTP и dTTP и 5 мкл 30 мМ раствора [α -³²P]dATP и 1 мкл (1 ед. акт.) раствора ДНК-полимеразы Кленова. Полимеразную реакцию проводили 15 мин при комнатной температуре и останавливали, прибавляя 20 мкл 0,5 М EDTA. Затем раствор обессоливали фильтрацией через колонку (0,7×15 см) с биогелем А 1,5м в буфере *H*, контролируя процесс с помощью приставки МСФП-1 и счетчика Гейгера типа Thiac-III, ДНК осаждали с тРНК-носителем, растворяли и подвергали электрофорезу в пластине агарозного геля. Найденные величины *EcoRI*- и *HindIII*-фрагментов приведены в таблице и на рис. 1.

Наборы меченных по концам *EcoRI*-фрагментов ДНК λ и λ att80rif^d35, полученных как описано выше, растворяли и расщепляли рестриктазой *HindIII* в приведенных выше условиях и затем смесь *EcoRI/HindIII*-фрагментов подвергали электрофорезу в пластинах агарозного и полиакриламидного геля. Найденные величины *EcoRI/HindIII*-фрагментов приведены в таблице.

Набор меченных по концам *HindIII*-фрагментов ДНК λ , полученный как описано выше, растворяли и расщепляли рестриктазой *EcoRI* в приведенных выше условиях и затем смесь *HindIII/EcoRI*-фрагментов подвергали электрофорезу в пластинах агарозного и полиакриламидного геля. Найденные величины *HindIII/EcoRI*-фрагментов приведены в таблице.

Получение HindIII-фрагмента В ДНК λ rif^d47. 1 мг смеси ДНК λ rif^d47 и ДНК λ , полученной как описано в работе [3], растворяли в 5 мл буфера *O*, прибавляли 0,5 мл раствора рестриктазы *SmaI* (0,2 ед. акт.) и инкубировали 3 ч при 30° С до завершения гидролиза, следя за его полнотой с помощью электрофореза аликвот (по 20 мкл) в 1% агарозном геле. Затем к раствору прибавляли 0,5 мл 3 М AcONa и 10 мл спирта, замораживали при -70° С, оттаивали, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, осадок высушивали в вакууме и растворяли в 1 мл воды. К полученному раствору прибавляли 100 мкл буфера *L* и 100 мкл раствора рестриктазы *HindIII* (0,3 ед. акт.), инкубировали 4 ч при 37° С до завершения гидролиза, следя за его полнотой с помощью электрофореза аликвот (по 5 мкл) в 1% агарозном геле. Затем к раствору прибавляли 50 мкл 50% раствора сахарозы в 10 мМ EDTA, содержащего по 0,02% бромфенолового синего и ксиленцианола *FF*, наносили на 1% агарозный гель в буфере *H* в 6 трубках размером 1,4×15 см и проводили электрофорез при напряжении 40 В до прохождения ксиленцианолом *FF* расстояния 10 см.

После прокрашивания столбиков геля раствором бромистого этидия (1 мг/л) верхние 4 зоны (R_{FF} 0,55; 0,60; 0,65 и 0,75) вырезали и ДНК из них извлекали как описано ранее [3]. По 0,2 мкг ДНК из полученных фракций и контрольный образец ДНК λ rif^d47 гидролизировали *EcoRI*, вво-

дили радиоактивную метку с помощью ДНК-полимеразы и [α - 32 P]дАТР, как описано ранее [3], и подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле. Лишь в ДНК из зон с R_{FF} 0,60 и 0,75 обнаружены полосы *EcoRI*-фрагментов К и J. Следовательно, в этих зонах содержится *HindIII*-фрагмент В. Выход *HindIII*-фрагмента В составлял 30–50 мкг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lindahl L., Yamamoto M., Nomura M., Kirschbaum J. B., Allet B., Rochaix J.-D. (1977) *J. Mol. Biol.*, **109**, 23–47.
2. Миндлин С. Э., Ильина Т. С., Горленко Ж. М., Хачикян Н. А., Ковалев Ю. Н. (1976) *Генетика*, **12**, 116–130.
3. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Колосов М. И. (1978) *Биоорганич. химия*, **4**, 628–638.
4. Ильина Т. С., Зворыкина Н. М., Нечаева Е. В., Сварчевский А. Н., Рыбчин В. Н. (1977) *Генетика*, **13**, 1809–1820.
5. Ильина Т. С., Нечаева Е. В. (1977) *Генетика*, **13**, 2181–2188.
6. Boros I., Kiss A., Venetianer P. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **6**, 1817–1830.
7. Thomas M., Davis R. W. (1975) *J. Mol. Biol.*, **91**, 315–328.
8. Fiantt M., Hradecna Z., Lozeron H. A., Szybalski W. (1971) in: *The Bacteriophage Lambda* (Hershey A. D., ed.), pp. 329–354, Cold Spring Harbor, N. Y.
9. Devine E. A., Moran M. C., Jederlinic P. J., Mazaitis A. J., Vogel H. J. (1977) *J. Bacteriol.*, **129**, 1072–1077.
10. Mazaitis A. J., Palchaudhuri S., Glandsdorff N., Maas W. K. (1976) *Mol. Gen. Genet.*, **143**, 185–196.
11. Glaser G., Enquist L., Cashel M. (1977) *Gene*, **2**, 159–172.
12. Tanaka T., Weisblum B. (1975) *J. Bacteriol.*, **124**, 354–362.
13. Jovin T. M., Englund P. T., Bertsch I. L. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2996–3008.
14. Klenow H., Henningsen I. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 169–175.
15. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber R. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2561–2572.
16. Shaltiel Sh., Er-el Z. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 778–781.

Поступила в редакцию
26.XI.1979

COMPARATIVE ANALYSIS OF $\lambda att80$, $\lambda att80rif^{d35}$ AND λrif^{d47} PHAGE DNAs

GUREVICH A. I., AVAKOV A. E., KISELEVA O. A.,
DANILEVSKAYA O. N., KOVALEV Yu. N.

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

The positions of *EcoRI* and *HindIII* sites are determined in DNAs of hybride phage $\lambda att80$ and transducing phages λrif^{d47} and $\lambda att80rif^{d35}$. The comparison of the restrictase maps thus obtained and the map of λrif^{d18} DNA published earlier elucidate the disposition of the regions of λ DNA, $\varnothing 80$ DNA and *E. coli* bacterial DNA in the phage DNAs. The positions are found of secondary sites of integration into the locus *bfe* of the phage λ (two sites) and the phage $\varnothing 80$ (approximate position of one site).