ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
LXVI 1978 5

УДК 537.1442

БИОХИМИЯ

Р. А. Захарян, А. С. Сафарян, Э. Г. Захарян,
В. С. Сафарян, К. С. Карагезян, В. В. Носиков

Структурный анализ ДНК фага Mdp8

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР Э. Г. Африкяном 3/IV 1978)

Для физико-химической характеристики, анализа структуры и функции ДНК различных репликонов успешно применен рестрикционный анализ эндонуклеазами-рестриктазами II типа. Использование эндонуклеаз рестрикции позволяет провести физическое картирование линейной структуры ДНК, топографический анализ взаиморасположения генов, локализовать в структуре репликона сайты инициации транскрипции и репликации, изучить последовательность экспрессии генома. Рестрикционный анализ незаменим для установления гомологий в структуре ДНК и изоляции специфических генов в целях генной инженерии.

Натанс и сотр. ([1]) одни из первых установили карту участков транскрипции ДНК вируса SV-40 с помощью эндонуклеазы Haemophilus influenzae, фрагментирующий ДНК SV-40 в 10 участках. Полное картирование этой же ДНК и ДНК фага ФХ174 успешно было осуществлено анализом перекрывающихся фрагментов, продуцируемых двумя различными ферментами ([2]).

Ферменты рестрикции из Haemophilus parainfluenzae I и II и рестриктаза E_{co}RI успешно были использованы для картирования митохондриальной ДНК; была установлена уникальность сайтов рестрикции в структуре ДНК для данного организма ([3]). Большая часть физической карты цистрона, кодирующего 42-S рибосомальный предшественник, была расшифрована с помощью ([4]) рестрикционных эндонуклеаз E_{co} RI; Hind II, Hind III—([4]). Рестрикционные эндонуклеазы успешно были использованы в нескольких работах Доерфлер, посвященных характеристике внутриклеточных форм ДНК Ad2, а также уточнению транскрипционной карты ДНК Ad2 ([5]).

Описано физическое картирование целого ряда R-плазмид ([6]).

В данном сообщении электрофоретически изучены продукты рестрикционного расщепления ДНК фага Mdp8 ферментами-рестриктазами E_{co} RI, Hind III, Sal I, Hpa I, Pst I, BamH I, Kpn I. Фаг Mdp8 принадлежит к группе родственных фагов группы Mdp1—8, выделенных из

лизогенных штаммов Salmonella derby ([7]). В плане структурного анализа изучение ДНК этих родственных фагов представляет определенный интерес и позволит оценить общность и различия структурной организации единиц оперона в составе структуры различных репликонов.

Фаг Mdp8 выделен из лизата индикаторного штамма K89S derby; ДНК фага Mdp8 и «лямбда» получали из фаголизатов по Мак-Хетье ([8]). Ферменты-рестриктазы E_{co} RI; Hind III; Sal I; Hpa I; Pst I, BamH I, Kpn I, выделены в лаборатории биокатализа Института молекулярной биологии АН СССР из соответствующих штаммов, по специфической методике выделения для каждого энзима, включающих как обязательные следующие последовательные этапы очистки: ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе и КМ-целлюлозе; Р-целлюлозе и хроматография на гидроксилаппатите.

Препараты ДНК инкубировали в соответствующей инкубационной среде для каждого энзима, и после рестрикции полученные фрагменты фракционировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле с бромидом этидия при напряжении в 20 *в*; время электрофореза—16 часов. Рестрицированные фрагменты выявляли в геле в спектре ультрафиолета 250—320 *ммк*. Фрагменты ДНК фага «лямбда», генерируемые рестриктазами, были использованы а качестве маркеров для определения молекулярных весов фрагментов ДНК фага Mdp8.

ДНК фага Mdp8 расщепляется при действии используемого набора рестриктаз на различное количество фрагментов, рис. 1.

Рестрикционный анализ ДНК Mdp8 энзимом Pst I свидетельствует о наличии в структуре ДНК фага Mdp8 четырех сайт-специфических нуклеотидных последовательностей 5′ЦТГЦАГ3′ с осью симметрии второго порядка,

3′ГАЦГТЦ5′

рекогниция и рестрикция которых эндонуклеазой Pst I образует 5 фрагментов с когезивными концами.

Рестриктаза E_{co} RI расщепляет ДНК Mdp8 на пять относительно крупных фрагментов, что также указывает на присутствие в структуре ДНК четырех специфических палиндромов со следующей последовательностью оснований 5′ГААТТЦ3′

3′ЦТТААГ5′

Наибольшее число фрагментов образуется при действии рестриктазы Hpa I. Эти фрагменты перекрывают область молекулярных весов от $7{,}5 \cdot 10^6$ до $0{,}4 \cdot 10^6$ дальтон. Насчитывается около 25 фрагментов при неполном гидролизе и 13 при полном расщеплении, что показывает на присутствие в структуре ДНК Mdp8, по крайней мере около 24 палиндромов с последовательностью 5′ГТТААЦ3′

3′ЦААТТГ5′

с осью симметрии первого порядка.

Рестриктаза BamH I, расщепляющая последовательность Г↓ГАТЦЦ ЦЦТАГГ, как и рестриктаза Kpn I не имеет участков узнавания на ДНК фага Mdp 8.

Рестриктаза Sal I расщепляет ДНК фага Mdp 8 по палиндрому 5′ГТЦГАЦ3′, по-видимому, в нескольких точках с формированием 3′ЦАГЦТГ5′ ↑ крупных фрагментов, которые ввиду близости молекулярных весов не фракционируются в геле.

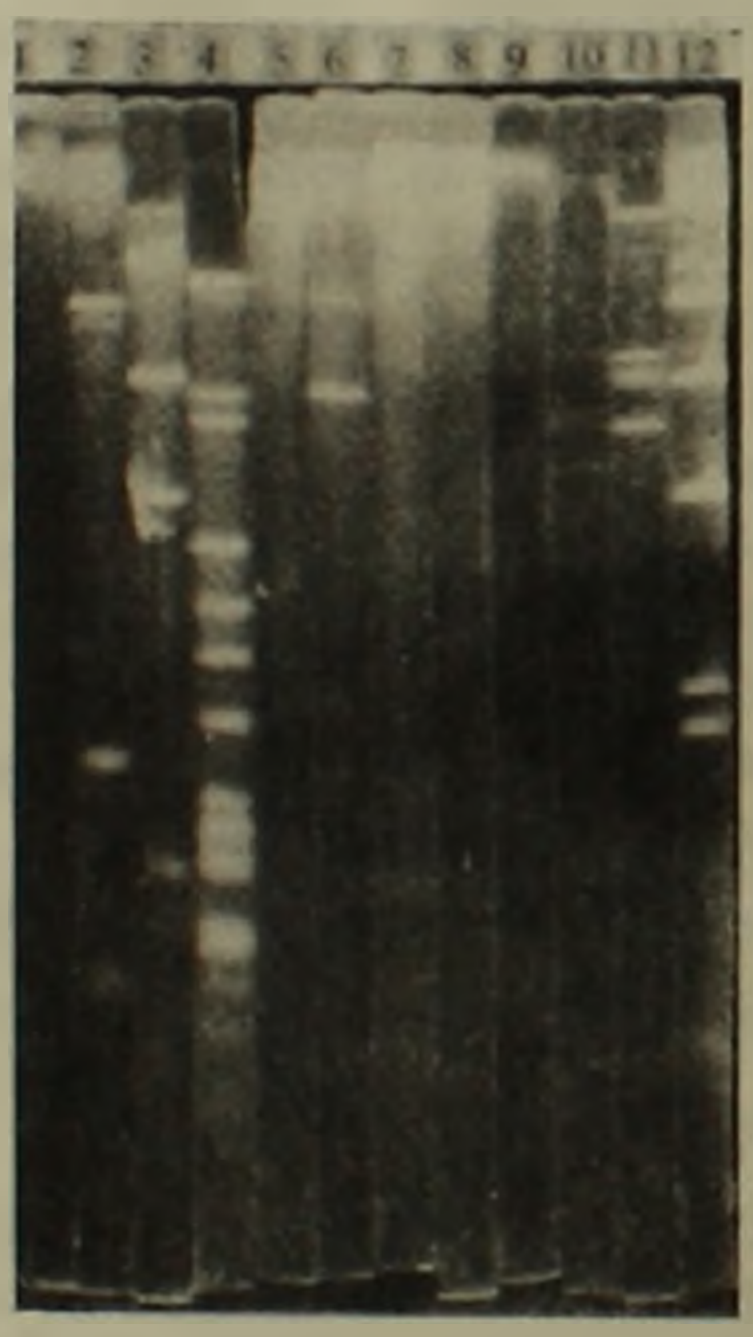

Рис. 1 Электрофоретическое распределение фрагментов ДНК фага Mdp8 и фага „лямбда", рестрицированных рестриктазами.
1—ДНК фага Mdp8; *2*—ДНК Mdp8 рестрицированная эндонуклеазой Pst I; *3*—эндонуклеазой E_{co}RI; *4*—HpaI; *5*—BamHI; *6*—HindIII; *7*—KpnI; *8*—SalI, *9*—ДНК фага „лямбда", рестрицированная эндонуклеазой SalI; *10*—ДНК „лямбда", рестрицированная ферментом E_{co}RI; *11*—ферментом BamHI; *12*—ферментом Hind III

Рестриктаза Hind III расщепляет ДНК фага Mdp 8 на три относительно крупных фрагмента. Сайт-специфическая последовательность оснований, полиндром: 5′ААГЦТТ3′ встречается в структуре данной 3′ТТЦГАА5′

ДНК, по-видимому, в двух точках, хотя и второй фрагмент от старта обнаруживается в относительно меньшем количестве.

В последующих гелях на рис. 1 показано распределение в качестве маркеров по молекулярному весу фрагментов ДНК «лямбда», рестрицированных ферментами Sal I, E_{co} R I, BamH I и Hind III (9).

На рис. 2 изображено электрофоретическое распределение в агарозном геле фрагментов ДНК Mdp 8, продуцируемых совместно двумя различными ферментами.

Совместное расщепление ДНК Mdp 8 двумя энзимами Hind III и E_{co} R I свидетельствует о том, что из получаемых пяти фрагментов (гель 4) два первых фрагмента находятся в составе первого фрагмента (гель 3), а три последующих фрагмента в составе второго относительно крупного фрагмента геля 3.

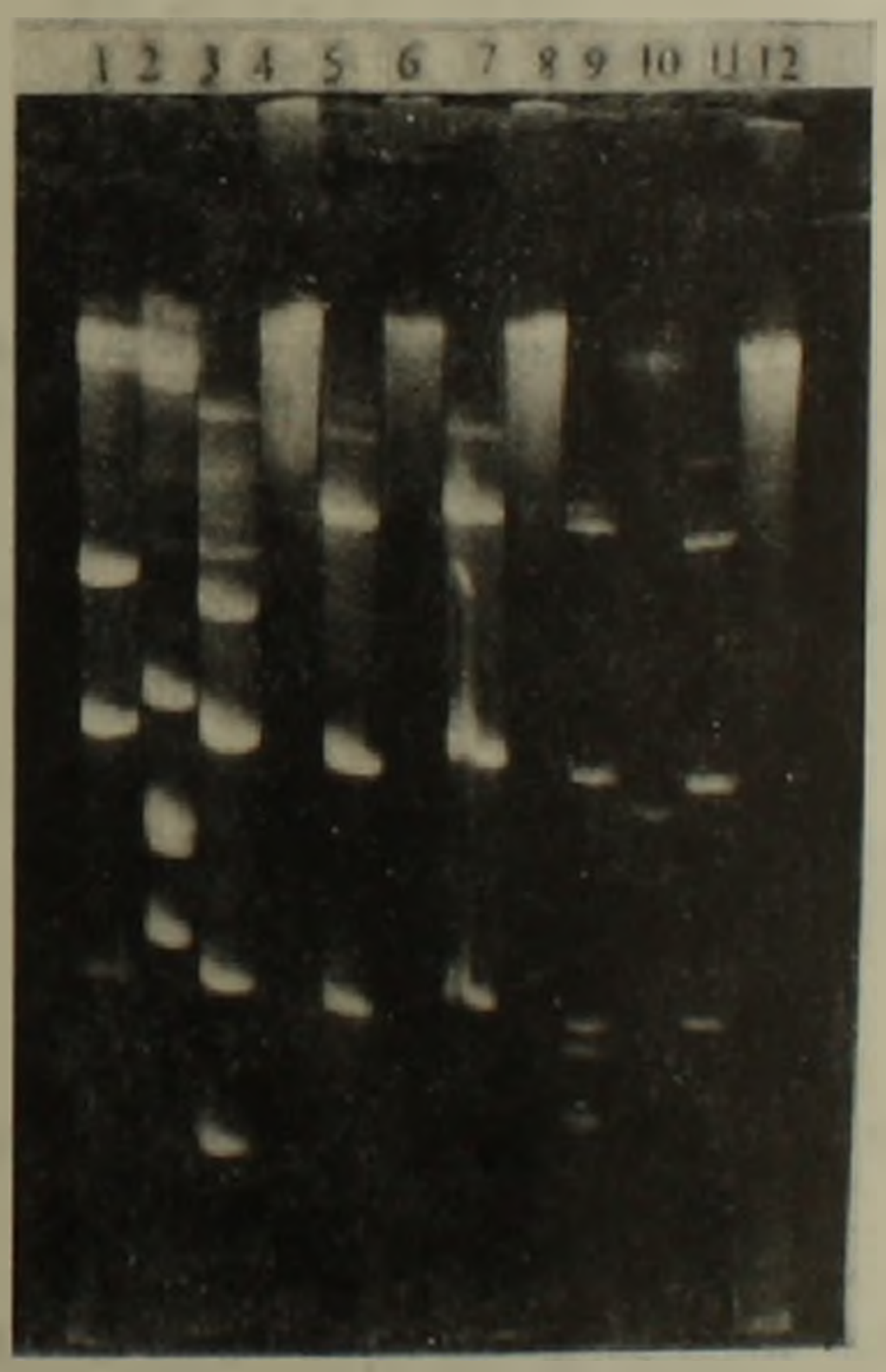

Рис. 2. Электрофоретическое распределение фрагментов ДНК фага Mdp8, рестрицированных совместным действием двух рестриктаз.
1—ДНК „лямбда", рестрицированная Hind III *2*—EcoRI; *3*—ДНК Mdp8, рестрицированная SalI + EcoRI; *4*—SalI; *5*—BamI + EcoRI, *6*—BamI, *7*—KpnI + EcoRI, *8*—KpnI; *9*—EcoRI + Hind III, *10*—Hind III *11*—EcoRI; *12*—ДНК Mdp 8

Совместное расщепление ДНК Mdp 8 энзимами E_{co} R I и Kpn I, Bam I и E_{co}R I еще раз подтверждает, что в данной ДНК отсутствуют

сайты расщепления для Kpn I и Bam I; в то же время совместное действие Sal I и E_{co}R I действительно указывает на то, что палиндромы, специфичные для Sal I, присутствуют в ДНК Mdp8 в малом числе и на их основе при рестрикции получаются крупные фрагменты, обнаруживающие себя при совместном действии с энзимом E_{co}R I. Данные рисунка 2 в определенной степени конкретизируют распределение соответствующих полиндромных нуклеотидных последовательностей в структуре ДНК Mdp8.

Молекулярные веса фрагментов расщепленной ДНК Mdp8

Рестрикция ферментом	Величина молекулярных весов ($x10^6$ дальтон) фрагментов ДНК Mdp 8	Молекулярный вес Mdp8 $x10^6$ дальтон
Hpa I	6.5. 4.0; 3,5; 2,2; 1,9; 1,6; 1.2; 1.0. 0.9; 0,8; 1,0;	23,6
E_{co}RI	11,0. 7,5; 4,0; 2,7; 0,8;	26,0
PstI	20,0; 6.0 5,5; 1,1; 0,8;	33,4
Hind III	15,0. 6,0. 3.8,	24,8

Молекулярные веса фрагментов ДНК Mdp 8, генерируемых соответствующими рестриктазами, оценены относительно подвижности фрагментов ДНК λ ([9]) и приведены в таблице.

Молекулярный вес ДНК Mdp8 вычислен около $(28\pm2)\times10^6$ дальтон.

Авторы благодарят Ж. А. Кцоян за предоставление фаголизата Mdp 8.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ռ. Ա. ՋԱՔԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ՍԱՅԱՐՅԱՆ, Է. Գ. ՋԱՔԱՐՅԱՆ, Վ. Ս. ՍԱՅԱՐՅԱՆ,
Կ. Ս. ԿԱՐԱԳԵԶՅԱՆ, Վ. Վ. ՆՈՍԻԿՈՎ

ԴՆԹ-ի Mdp8 ֆագի ստրուկտուրային անալիզը

Տարբեր ռեպլիկոններում ԴՆԹ-ի ստրուկտուրայի և ֆունկցիայի ֆիզիկաքիմիական բնութագրի համար հաջող օգտագործվում է ռեստրիկցիոն անալիզի 2-րդ տիպի էնդոնուկլեազ-ռեստրիկտազաներով։

Այս աշխատանքում կատարված է ԴՆԹ-ի Mdp8 *ֆագի ռեստրիկցիա 2-րդ տիպի մի շարք ֆերմենտներով՝* EcoRI, HpaI, PstI, HindIII, KpnI; SalI։ *Որոշվել է ստացված ֆրագմենտների մոլեկուլային կշիռը։ ԴՆԹ-ի* Mdp8 *ֆագի մոլ. կշիռը կազմում է* $28\pm2\times10^6$ *դալտոն։*

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *G. Khoury, M. Martin, T. Lee, K. Danna, D. Nathens*, J. Mol. Biol, 78, 377 (1973). [2] *A. S. Lee, R. L. Sinsheimer*, Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., 71, 2882 (1974). [3] *F. M. DeFillippes, M. M. Nass*. Hand. of genetics 5, 477 (1976). [4] *I. H. Meyerink, J. Retel, R. J. Planta*, Molecular Biology Reports, 2, 391 (1976). [5] *W. Doerfler*, Abstracts X internat. Biochem. congress, Hamburg (1976). [6] *N. Tanaka, J. H. Cramer, R. Rownd*, J. Bacteriol. 127, 619 (1976). [7] *М. К. Вартикян, Б. П. Карабеков*, Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 97, Ереван, 1970. [8] *Mc Chetija*. J. Mol. Biol., 23, 355 (1967). [9] *R. J. Roberts*, Critical Reviews in Biochem., 4, 2, 123 (1976)