

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДНК
 БАКТЕРИОФАГА ρf 16

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Изучены физико-химические свойства ДНК трансдуцирующего фага ρf 16. По спектру кругового дихроизма, методу Фельзенфельда и температуре плавления определено содержание ГЦ-пар в молекулах ДНК. При выделении ДНК горячим фенольным методом значительно уменьшается молекулярный вес исходного препарата ДНК (седиментационные данные). Исходный молекулярный вес может быть оценен по степени сглаженности дифференциальной кривой плавления.

Фаг ρf 16 является одним из трех описанных в литературе фагов (PPI [1], ρf 16 [2, 18], PX4 [3]), осуществляющих генерализованную трансдукцию среди штаммов *Pseudomonas putida*. Некоторые из этих штаммов несут гены биodeградации ароматических соединений.

Фаг ρf 16 впервые был изолирован из штамма PpG1, катаболизирующего камфору, как хозяйский вариант ρf 16h1, и использован для генетического анализа триптофанового оперона [4], а также для трансдукции плазмид биodeградации [5]. Вариант фага ρf 16 ρf 16h2 был использован при трансдукции манделаткатаболизирующих *mdl* генов хромосомальной локализации штамма PRSI в штамм PpG2. Анализ трансдуктантов показал, что в процессе трансдукции дефектного фага ρf1dm формируются частицы, в которых часть генома фага (от 35 до 70%) замещена на бактериальные гены *mdl* и которые обнаруживаются в бактериальной клетке в виде суперспирализованных плазмидных ДНК [6]. Не исключается, что аналогичным может быть формирование и плазмид биodeградации.

В связи с приведенным представляет интерес изучение физико-химических характеристик ДНК фага ρf 16.

Материал и методика. Препараты фага ρf 16, выращенные на бактериях *Pseudomonas putida* PpG1, получали от Кочаряна Ш. М. Бактериофаг ρf 16 из лизата штамма PpG1 концентрировали путем дифференциального центрифугирования в градиенте CsCl (центрифуга УЦП-60, ротор типа РКС-24,3×56 мл, 24 000 об/мин, 4 часа, 10°, плотность фаговых частиц 1,51).

После диализа ДНК фага экстрагировали горячим фенольным методом [7]. Содержание белка в препарате ДНК, определенное методом Лоури [8], составляло ~1%. Молекулярный вес выделенной ДНК определяли по методу скоростной седиментации [9] в 1×SSC. Центрифугирование проводили на аналитической ультрацентрифуге Spenco E (ротор AN-D) с ультрафиолетовой оптикой. Седиментограммы получали после фотометрирования пластинок на двухлучевом микрофотометре ИФО-451. Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрополяриметре Сагу-60 с КД-приставкой 6001. Кривые плавления получали на усовершенствованном для

прецизионных измерений спектрофотометре «Hitachi» с чувствительностью $\sim 10^{-4}$ оптических единиц. Регистрация кривых проводилась при непрерывном повышении температуры в термостатированной ячейке со скоростью 0.15 град/мин. Кривые плавления дифференцировали графическим способом [10].

Результаты и обсуждение. Получены спектры КД ДНК в растворителях 0,1XSSC и 7,2 М NaClO₄ (концентрация ДНК в растворе 50 мкг/мл). В 0,1XSSC (рис. 1) они соответствуют спектру ГЦ-богатой

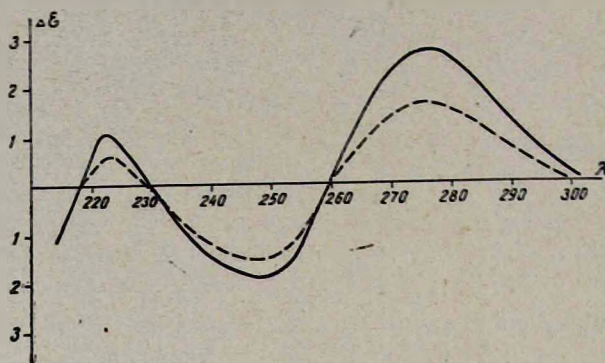


Рис. 1. КД-спектры ДНК рI 16 в единицах молярного дихроизма ($\Delta\epsilon$) в растворителях: (—) 0,1XSSC, (---) 7,2 М NaClO₄.

ДНК в В-форме [11]. При переносе ДНК в концентрированный раствор перхлората натрия наблюдается переход в направлении В→С [12], о чем свидетельствует уменьшение амплитуды положительной полосы при небольшом изменении амплитуды отрицательной.

Определенная по кривой плавления ДНК рI 16 в 0,1XSSC температура плавления (T_m) оказалась равной $(82,2 \pm 0,05)^\circ$ (рис. 2). Это значение соответствует $(69 \pm 1)\%$ -ному содержанию ГЦ-пар в ДНК [13]. Обработка денатурационной кривой по методу Фельзенфельда [14] (рис. 3) также указывают на содержание ГЦ-пар $(70 \pm 5)\%$.

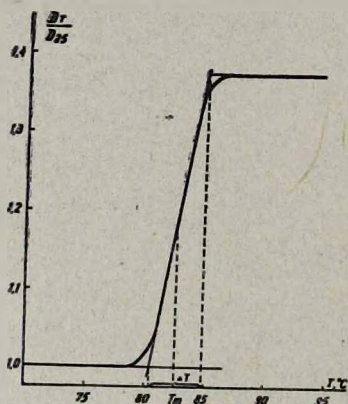


Рис. 2.

Рис. 2. Интегральная кривая плавления ДНК.

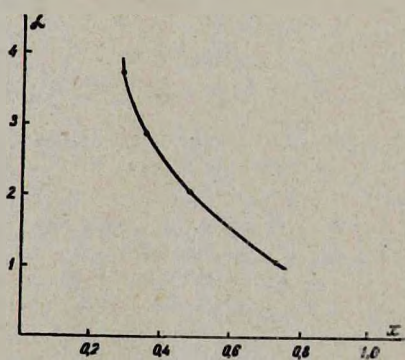


Рис. 3.

Рис. 3. Градуировочная кривая для определения ГЦ-содержания ДНК по Фельзенфельду.

Моль-процент ГЦ-пар находили по градуировочной кривой, построенной по формуле $X_{ГЦ} = \frac{29,3 - z}{20z - 14,5}$, где $z = \frac{\Delta A_{260}}{\Delta A_{280}}$, ΔA_{260} — разность поглощений при 260 нм полностью денатурированной и нативной ДНК, ΔA_{280} — та же разность при 280 нм (при этой длине волны преимущественно поглощают пары ГЦ). Не исключается присутствие в структуре ДНК фага рf 16 5-СН-цитозина, обуславливающего относительно высокую температуру плавления.

Ширина интервала плавления определялась по кривой плавления как $\Delta T = \frac{1}{\left(\frac{\partial \theta}{\partial T}\right)_{T - T_m}}$ (здесь θ — степень спиральности молекул ДНК).

Она оказалась равной $(3,9 \pm 0,1)^\circ$. Такой интервал плавления характерен для ДНК вирулентных фагов с квазислучайной последовательностью [15, 16].

Как известно [10], при дифференцировании кривой плавления выявляются особенности, незаметные на интегральной кривой. Можно видеть (рис. 4), что в молекулах ДНК нет участков, распределение

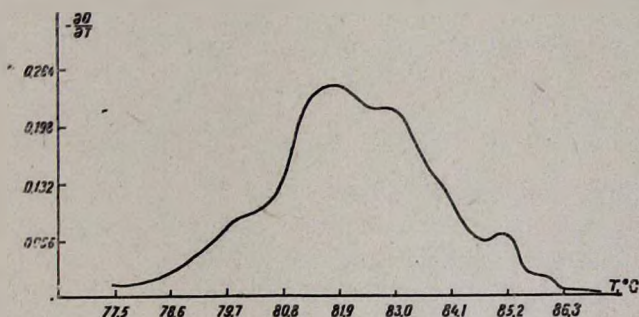


Рис. 4. Нормированная дифференциальная кривая плавления ДНК фага рf 16.

пар оснований в которых резко отличалось бы от среднего. Дифференциальная кривая плавления по степени сглаженности схожа с кривой плавления ДНК с молекулярным весом 100×10^6 дальтон [10]. Такое значение молекулярного веса ДНК согласуется с электронномикроскопическими данными [17, 18], а также с результатами, приведенными в работе Чакрабартти, Гонзалес [6]. Однако полученный методом ультрацентрифугирования [9] молекулярный вес ДНК составил $(29 \pm 0,3) \times 10^6$ дальтон. Это понижение исходного значения молекулярного веса ДНК является, по-видимому, следствием деградации молекул ДНК при выделении.

Выражаем благодарность Ю. С. Лазуркину и Ю. Л. Любченко за предоставленную возможность для проведения работы и Л. С. Шляхтенко и Ю. А. Банникову за помощь в работе.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 13.III 1978 г.

Ա. Գ. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ. Ռ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրված են pf16 տրանսդուցող ֆագի ԴՆԹ-ի ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները: Այդ ԴՆԹ-ի շրջանային դիստրիբյուցիոն սպեկտրը համապատասխանում է ԳՑ-ըույզերով հարուստ B-ձևի ԴՆԹ-ի սպեկտրին: Կոնցենտրացված աղային լուծույթի մեջ ($\gamma, 2 \text{ M NaClO}_4$) ԴՆԹ-ն վեր է ածվում C- ձևի:

Ըստ հալման ջերմաստիճանի ($T_m = 82, 2^\circ \text{C}$) սովյալ ԴՆԹ-ի ԳՑ-ըույզերի բաղադրությունը հավասար է 69% -ի:

ΔT հալման ինտերվալի լայնությունը, որը հավասար է $3, 9^\circ$, բնորոշ է վիրուսներ ֆագի ԴՆԹ-ն: Հալման դիֆերենցիալ կորի տեսքը թույլ է տալիս եզրակացնելու, որ ԴՆԹ-ի մոլեկուլների նախնական մոլեկուլյար կշիռը 100×10^6 դալտոնի կարգի է: Սակայն տաք ֆենոլային մեթոդով անջատման ընթացքում տեղի է ունենում մոլեկուլյար կշռի նվազում: Սեղիմենտացիոն հղանակով չափված անջատված ԴՆԹ-ի մոլեկուլյար կշիռը հավասար է 29×10^6 դալտոնի:

SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF DNA OF pf 16 BACTERIOPHAGE

A. G. GABRIELIAN, R. A. ZAKHARIAN

Some physico-chemical properties of DNA of pf 16 transducing bacteriophage have been studied. The contents of GC-pairs in DNA molecules has been determined, using the spectrum of circular dichroism, the melting point of DNA and Felsenfeld's method. Extraction of DNA by hot phenol method significantly decreases the molecular weight of initial preparation of DNA (data of sedimentation).

The differential melting curve permits to conclude that the initial molecular weight of DNA molecules is equal to 100×10^6 daltons.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Holloway B. W., van de Putte P. Nature, 419, 1968.
2. Chacrabarty A. M., Gunsalus C. F., Gunsalus J. C. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 60, 168, 1968.
3. Olsen R. H., Metcalf E. S., Todd I. K. J. of Virology, 2, 317, 1968.
4. Gunsalus L. C., Gunsalus C. F., Chacrabarty A. M., Stkes S., Crawford P. Genetics, Princeton, 60, 419, 1968.
5. Dann N. W., Gunsalus J. C. J. of Bacteriology, 114, 974, 1973.
6. Chacrabarty A. M., Gunsalus J. C. Virology, 38, 92, 1969.
7. Massie H. R., Zimm B. H. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 54, 1641, 1964.
8. Layre E. Meth. Enzym., 3, 447, 1957.
9. Freifelder D. J. Mol. Biol., 54, 567, 1970.
10. Lyubchenko Yu. L., Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. L., Lazurkin Yu. S., Gause G. G. Biopolymers, 15, 1019, 1976.
11. Usatyi A. F., Schlyachtenko L. S. Biopolymers, 12, 45, 1973.

12. Zimmer Ch., Luck G. *Biochim. et Biophys. Acta.* 361, 11, 1974.
13. Marmor J., Doty P. *J. Mol. Biol.*, 5, 109, 1962.
14. Felsenfeld G., Hirschman S. Z. *J. Mol. Biol.*, 13, 407, 1965.
15. Шугалий А. В., Франк-Каменецкий М. Л., Лазуркин Ю. С. *Мол. биол.* 5, 766, 1971.
16. Frank-Kamenetskii M. D., Lazurkin Yu. S. *Ann. Rev. Biophys. (Bioenerg.)* 3, 127, 1974.
17. Акопян С. М., Захарян Р. А., Агабалян А. С., Захарян Э. Г., Кочарян Ш. М. Тезисы 15 Чехословацкой конф. по электронной микроскопии. Прага, 1977.
18. Акопян С. М., Галустян М. Г., Агабалян А. С., Захарян Э. Г., Амирханова Л. М., Азарян Н. Г., Арутюнян Д. Г., Захарян Р. А. *Биологический журнал Армении*, 30, 12, 1977.