ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXII, 10, 1979

УДК 616.988

АНАЛИЗ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ ДНК ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ РЕСТРИКТАЗАМИ

С. З. СИМОНЯН

ДНК вируса осповакцины была расщеплена рядом рестриктаз. Размеры и количество фрагментов, образующихся при действии рестриктаз Eco RI, Bam HI, Hind III и Kpn I, были определены методом электрофореза в агарозном геле и при анализе ДНК вируса осповакцины, меченной H^3-тимидином. Истинное количество Eco RI и Bam HI фрагментов было определено лишь при анализе фрагментов ДНК осповакцины, меченных H^3-тимидином.

Рестриктазы нашли широкое применение в исследовании геномов плазмид [13], фагов [15] и ряда вирусов, таких как SV40 [4], полиома [3], аденовирус [14] и герпесвирус [16]. Использование рестриктаз позволяет проводить картирование вирусной ДНК, определять его участки, ответственные за инициацию и терминацию репликации ДНК [7, 12], локализовать ранние и поздние гены [12].

ДНК вируса осповакцины представляет собой двухцепочечную молекулу размером 120—130 млн. дальтон и имеет поперечные сшивки недалеко от концов молекулы [2, 9]. Нами проведен анализ ДНК вируса осповакцины с помощью ряда рестриктаз, определено количество и размеры фрагментов и изучено распределение фрагментов, образующихся при действии рестриктаз, по молекулярным весам.

Материал и методика. Вирус осповакцины, штамм Элстри, был очищен по методу Джоклика [11]. Очищенный вирус образовывал гомогенный дискретный пик в градиенте сахарозы. При электронномикроскопическом контроле в поле зрения были обнаружены только вирионы, обладающие характерной формой.

Выделение ДНК вируса осповакцины проводили суспендированием вирионов в 0,15 М NaCl, 0,01 М ЭДТА и 0,01 М трис-HCl буфере, pH 8,0. После короткой обработки ультразвуком к раствору добавляли саркозил NL 97 до конечной концентрации 10 мг/мл и проназу (2 мг/мл). Инкубацию проводили в течение 30—40 мин при 37° до полного осветления раствора. Депротеинизацию проводили двухкратной обработкой фенолом (pH 8,0), полноту депротеинизации контролировали по исчезновению интерфазы. Отдиализованную против 0,01 М трис-HCl, 0,02 М NaCl буфера, pH 7,6, ДНК использовали для расщепления рестриктазами. ДНК λ с F857S7 была любезно предоставлена В. М. Крюковым (Институт молекулярной биологии, Москва). Рестриктазы выделяли по методам: Eco RI—по Грину [10], Bam HI—по Уилсону [17], Sal I—по Эстебану [16]. Рестриктазы Hpa I и Hind III были выделены по неопубликованному методу Дж. Робертса. Рестриктаза Kpn I была любезно предоставлена Н. Н. Фодором (Институт микробиологии, Пущино). Реакционные смеси для расщепления ДНК вируса осповакцины и ДНК фага λ содержали: для Eco RI—100 мМ трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl, pH 7,2, для Bam HI—10 мМ трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$,

pH 7.5; для Sal I—10 мМ трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 150 мМ NaCl, pH 7.5; для HpaI—10 мМ трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 20 мМ KCl, pH 7.5; для Кpn I—10 мМ трис-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ NaCl, pH 7.5. Реакционные смеси содержали 0,5—2 мкг ДНК, ферменты добавляли в количествах 0,5—2 мкл и инкубировали в течение 1—3 час. при 37°. Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в 0,7—1,4%-ном агарозном геле (Sigma).

Размеры фрагментов определяли по их подвижности в агарозном геле при электрофорезе, причем в качестве стандартов использовали фрагменты, образующиеся при расщеплении ДНК фага λ рестриктазами Eco RI [15], Hpa I [5], Sal I [1].

Для определения молекулярных весов крупных и мелких фрагментов мы использовали разные условия электрофореза. Хорошее разделение фрагментов, размеры которых меньше 3 млн. дальтон, было достигнуто при электрофорезе в 1,4—1,6%-ном агарозном геле (рис. 1). Для разделения крупных фрагментов использовали 0,7%-ный агарозный гель, в котором удалось получить хорошее разделение фрагментов, размеры которых достигали 20 млн. дальтон (рис. 2). И, наконец, для разделения очень

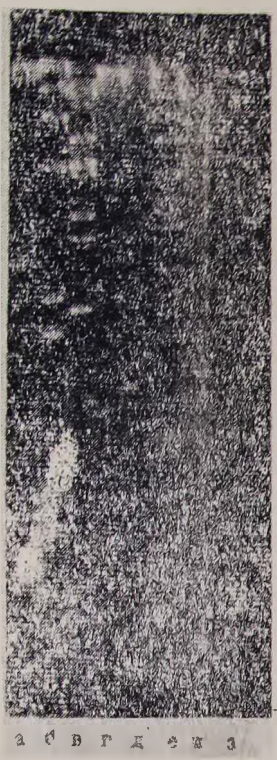

Рис. 1.

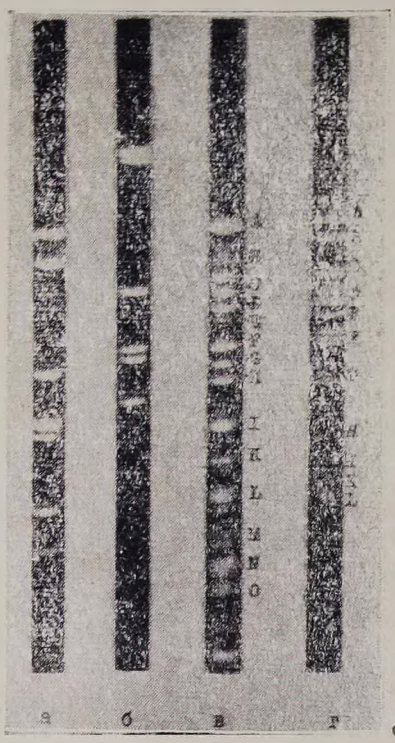

Рис. 2.

Рис. 1. Разделение низкомолекулярных фрагментов ДНК осповакцины методом электрофореза в агарозном геле. 1,6%-ный агарозный гель (Sigma), 17 в/см, 26 час.; расщепление ДНК λ рестриктазами: а) Кpn I; б) Hind III; в) Hpa I; расщепление ДНК осповакцины рестриктазами: г) Кpn I; д) Sal I; е) EcoR I; ж) Hind III; з) Bam HI.

Рис. 2. Разделение фрагментов ДНК осповакцины методом электрофореза в 0,7%-ном агарозном геле (Sigma); 22 в/см, 18 час.; расщепление ДНК λ рестриктазами: а) Hpa I; б) EcoR I; расщепление ДНК осповакцины рестриктазами, в) EcoR I; г) Bam HI.

крупных фрагментов, образующихся при действии на ДНК вируса осповакцины рестриктаз Kpn I и Hind III, использовали 0,6%-ный агарозный гель. Электрофорез проводили при низкой температуре (4°), низком напряжении и длительное время. Эти условия позволили разделить фрагменты с очень большими молекулярными весами (рис. 3).

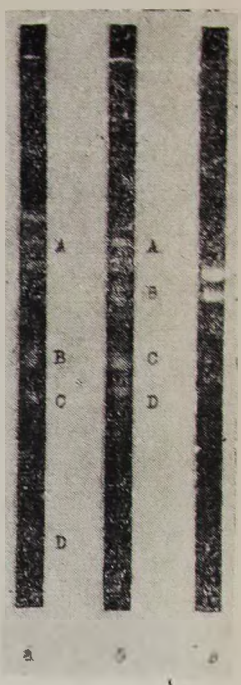

Рис. 3. Разделение фрагментов ДНК осповакцины методом электрофореза в 0,6%-ном агарозном геле (Sigma); 15 в/см, 36 час.: расщепление ДНК осповакцины рестриктазами: а) Hind III; б) Kpn I; расщепление ДНК λ рестриктазой: в) EcoR I.

Результаты и обсуждение. Определяя размеры генома осповакцины по сумме размеров фрагментов, образующихся при действии рестриктаз и разделяющихся при электрофорезе в агарозном геле, мы получили неожиданные результаты. Ниже приведены размеры ДНК осповакцины, вычисленные на основании этих данных:
Фермент EcoRI—90 млн. дальтон, Bam HI—77,34.
Kpn I—91,10, Hind III—128,10.

Естественно было предположить, что некоторые фрагменты не разделяются при электрофорезе и поэтому мы получаем такие значительные несоответствия между размерами ДНК осповакцины.

Чтобы определить, сколько фрагментов с одинаковыми или близкими размерами находятся в разных полосах ДНК, мы использовали для расщепления рестриктазами ДНК вируса осповакцины, меченную H^3-тимидином. После расщепления ДНК рестриктазами и разделения образующихся фрагментов путем электрофореза, трубочки геля разрезали, полоски геля, содержащие фрагменты ДНК, растворяли в протозоле и определяли, какое количество радиоактивной метки присутствует в каждой полосе. Результаты этих измерений приведены в таблице, где даются также значения удельной радиоактивности, то есть количество импульсов соотнесено с размерами (в млн. дальтон) измеряемо-

Таблица 3

Молекулярные веса фрагментов, полученных при расщеплении меченной H^3-тимидином ДНК осповакцины рестриктазами, их радиоактивность и удельная радиоактивность

EcoRI					Bam HI				
Фрагмент	Средний размер, млн. дальтон	Радиоактивность, имп./мин	Удельная радиоактивность	Количество фрагментов в полосе	Фрагмент	Средний размер млн. дальтон	Радиоактивность, имп./мин	Удельная радиоактивность	Количество фрагментов в полосе
A	7,34	2629	604	2	A	7,95	2919	370	1
	6,93	1680			B	6,30	2289	366	1
B	4,91	3795	702	2	C	5,01	1741	350	1
	4,91				D	4,37	3500	812	3
C	4,58	2687	587	2		4,37			
	4,58					4,37			
D	4,27	2484	581	2	E	4,08	1252	306	1
	4,27					3,74	2982	803	3
E	4,08	1122	275	1	F	3,74			
F	3,72	2289	620	2		3,74			
	3,72				G	3,28	1196	366	1
G	3,47	2255	650	2	H	2,78	728	262	1
	3,47				I	2,51	1600	637	2
H	3,31	1647	500	2		2,51			
	3,31				K	2,42	1589	656	2
I	2,82	3287	1165	4		2,42			
	2,82				L	2,32	2002	859	3
	2,82					2,32			
	2,82					2,32			
K	2,62	2300	890	3					
	2,62								
	2,62								
L	2,32	2184	941	3					
	2,32								
	2,32								
M	2,05	1312	640	2					
	2,05								
N	1,93	1634	837	2					
	1,92								
	1,93								
O	1,82	1101	598	2					
	1,82								

Hind III					Kpn I				
A	30,00	9218	432	3	A	23,0	2607	162	1
	18,50				B	14,5	4725	325	2
	16,00					14,5			
B	10,00	4044	416	3	C	9,53	5547	577	3
	9,40					9,53			
	9,30				D	9,53			
C	8,20	2092	256	1		8,50	3355	394	2
D	5,16	1702	330	2	E	8,50			
	5,16				F	3,80	897	200	1
E	3,90	1267	325	2	G	2,70	552	174	1
	3,90				H	2,50	762	194	1
F	3,10	768	248	1		2,0	410	205	1
G	2,70	710	262	1					
H	2,50	663	270	1					

го фрагмента. На основании этих данных и в сочетании с данными электрофоретического разделения фрагментов можно достаточно надежно определить, какое количество фрагментов содержится в каждой

полосе. Ниже приведены размеры ДНК осповакцины, полученные уже на основании суммирования молекулярных весов фрагментов, полученных при расщеплении рестриктазами ДНК осповакцины, меченной H^3-тимидином: фермент Eco RI—117,42, Bam HI—84,59, Hind III—131,89, Kpn I—108,6 млн. дальтон.

Легко видеть, что с учетом поправок, которые позволило ввести использование меченой ДНК осповакцины, размеры генома вируса, определяемые по сумме размеров фрагментов, образующихся при действии рестриктаз Eco RI, Kpn I и Hind III, очень близки к истинным размерам генома. В то же время использование меченой ДНК осповакцины в случае Bam HI практически не внесло изменений в распределение значений размеров фрагментов.

Таким образом, использование меченой ДНК осповакцины позволило установить, что значительное число фрагментов, образующихся при действии на ДНК осповакцины рестриктаз EcoRI, Kpn I и Bam HI, не могли быть разделены электрофорезом в агарозном геле, и лишь использование меченной H^3-тимидином ДНК позволило их идентифицировать. Возникает также вопрос, отличаются ли такие фрагменты и по структуре или же они полностью идентичны?

Наши дальнейшие исследования ДНК осповакцины и близкородственных ей вирусов, таких как нейровакцина и оспа коров, помогут нам ответить на этот вопрос.

Институт молекулярной биологии
АН СССР, Москва

Поступило 6.VI 1979 г.

ՌԵՍՏՐԻԿՏԱԶՆԵՐՈՎ ՕՍՊՈՎԱԿՑԻՆԱՅԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ԴՆԹ-Ի ՃԵՂՔՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ ԱՌԱՋԱՑՈՂ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐԻ ԱՆԱԼԻԶԸ

Ս. Զ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Աշխատանքում օսպովակցինայի վիրուսի ԴՆԹ-ն ճեղքման է ենթարկվել մի շարք ռեստրիկտազներով՝ Eco RI, Bam HI, Hind III, Kpn I ռեստրիկտազների աղդեցության ներքո առաջացող հատվածների չափսերը և քանակությունը որոշվել են էլեկտրաֆորեզի մեթոդով ագարոզային ժելում և H^3-թիմիդինով նշված օսպովակցինայի վիրուսի ԴՆԹ-ի անալիզի ժամանակ՝ Eco RI և Bam HI ռեստրիկտազների աղդեցությամբ առաջացած շատ հատվածներ ունեն միանման կամ մոտ չափսեր՝ Eco RI, և Bam HI հատվածների իրական քանակը որոշված է միայն H^3-թիմիդինով նշված օսպովակցինայի ԴՆԹ-ի հատվածների անալիզի ժամանակ՝

ANALYSIS OF DNA FRAGMENTS UNDER THE VIRUS DNA SPLITTING BY RESTRICTIONS

S. Z. SIMONJAN

The article presents data showing that the vaccina DNA is specifically cleaved into a limited number of fragments by the restriction

endonucleases EcoRI, BamHI, HindIII and KpnI. The number and size of fragments appearing at restriction action have been determined by gel electrophoresis. The exact number of EcoRI and BamHI fragments has been determined by the analysis of DNA fragments of vaccinia virus, labelled by H^3-timidine.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сафарян С. С., Тимко И., Носиков В. В.* ДАН АрмССР. *65*, 924, 1977.
2. *Berns K. I., Silverman C.* J. Virol., *5*, 299—304, 1970.
3. *Chen M. C. Y., Chand K. S. S., Salzman N. P.* J. Virol., *15*, 191—198, 1975.
4. *Danna K. J., Sack G. H., Nathans Jr. O.* J. Mol. Biol., *78*, 363—376, 1973.
5. *De Filippes F. M.* J. Virol., *17*, 227—238, 1976.
6. *Esteban M., Flores L., Holowczak J. A.* Virology, *82*, 163—181, 1977.
7. *Fareed G. C., Garon C. F., Salzman N. P.* J. Virol., *10*, 484—491, 1972.
8. *Gangemi J. D., Sharp D. G.* J. Virol., *20*, 319—323, 1976.
9. *Geshelin P., Berns K. I.* J. Mol. Biol., *88*, 785—796, 1974.
10. *Greene P. J., Betlach M. C., Goodman H. M., Boyer H. W.* Methods Mol., Biol. *7*, 87—111, 1974.
11. *Joklik W. K.* Virology, *18*, 9—18, 1962.
12. *Khoury G., Martin M. A., Lee F. N. H., Danna K. J., Nathans D.* J. Mol. Biol *78*, 377—389, 1973.
13. *Meyer R., Figurski D., Helinski D. R.* Molec. gen. Genet., *152*, 129—135, 1977.
14. *Peterson V., Mulder C., Delius H., Sharp P. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 200—204, 1973.
15. *Thomas M., Davis R. W.* J. Mol. Biol., *91*, 315—328, 1975.
16. *Wittie N. M.* J. Virol., *20*, 222—233, 1976.
17. *Wilson G. A., Young F. E.* J. Mol. Biol., *97*, 123—125, 1975.