XXXIII, 8, 799-803, 1980

УДК 577.323.01

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ И ДРУГИХ ФИЗИЧЕСКИХ СВОИСТВ ДНК ФАГОВ dp КУЛЬТУРЫ SALMONELLA DERBY

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Н. А. АБЛЯЗИМОВА, М. К. ВАРТАНЯН, К. С. КАРАГЕЗЯН, Э. Г. ЗАХАРЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Исследованы физические свойства ДНК фагов dp: dp 1, dp 2, dp 8 (хозяин—штаммч К 89 Salmonella derby) и dp 9 (хозяин—штамм LT2 Salmonella typhimurium). Совпадение величии молекулярных весов, спектров кругового дихронзма и особенно дифференциальных кривых плавления свидетельствует (в пределах чувствительности методов) об идентичности вторичных и первичных структур ДНК близкородственных фагов dp 1, dp 2, dp 8 Salmonella derby. ДНК фага dp 9, наряду с общими физическими свойствами с ДНК фагов dp 1, 2, 8, имеет резко отличную дифференциальную кривую плавления. Место расположения, ширина и площадь отделенного первого пика соответствуют выплавлению трех участков молекулы ДНК dp 9, обогащенных АТпарами.

Ключевые слова: фаги, ДНК, кривые плавления.

В последние годы изучение тонкой структуры кривых плавления ДНК привлекает все большее внимание [10, 15, 18]. Внесена значительная ясность в понимание механизма плавления ДНК и эффекта тонкой структуры дифференциальных кривых плавления (ДКП). Однако применение этих явлений в решении молекулярно-биологических задач находится на начальной стадии.

Данная работа посвящена сравнительному изучению особенностей первичной структуры различных ДНК методом тонкой структуры кривых плавления.

Материал и методика. Фаголизаты получали методом агаровых слоев по Грациа [1]. Фаговые ДНК выделяли по методу Мак-Хетье [9, 17]. Содержание белка в прегарате ДНК, определенное по Лоури [14], составило ~ 1%.

Маточные растворы ДНК готовили путем растворения ДНК из-под этилового спирта в 0,1×SSC. Затем в течение трех суток раствор диализовали против 0,1×SSC при 4° для очистки от низкомолекулярных примесей. Диализ растворов всех исследованных ДНК проводили против буфера одного приготовления во избежание погрешностей в ионной силе раствора, приводящих к сдвигу кривых плавления.

Плавление ДНК осуществляли в герметически закрытых кюветах, помещенных в термостатируемую ячейку. Температуру измеряли посредством термобатареи хромель-копель с точностью ±0,05°. Изменение оптической плотности растворов ДНК в процессе плавления измеряли на однолучевом спектрофотометре «Opton» с точностью 1×10⁻⁴ опт. ед. Регистрацию кривых плавления проводили при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,12 град/мин. Интегральные кривые, записанные с помощью планшетного потенциометра ПДП4-002, дифференцировали на ЭВМ фирмы

Хыюлетт-Паккард по программе «Melting», любезно предоставленной Е. И. Головановым. Режим дифференцирования—поточечный (до 1500 точек на кривую). Дифференциальные кривые нормировали машинным способом.

Средневесовой молекулярный вес (М –) выделенной ДНК определяли по методу скоростной седиментации в растворе 1×SSC [13]. Центрифугирование проводили на аналитической ультрацентрифуге Spinco-E (ротор—AN-D) с ультрафиолетовой оптикой при 20°. Скорость движения седиментационной границы фиксировали при 260 нм: фотографировали ее положение каждые 32 мин. В качестве границы пришмается точка, концентрация ДНК в которой составляет 1/2 величины концентрации на глато (поскольку граница даже монодисперсного седиментирующего вещества имеет конечную ширину из-за диффузии). Седиментограммы получали после фотографирования снимков на двухлучевом микрофотометре !IФO-!51. Спектры кругового дихроизма (КД) ДНК регистрировали на спектрополяриметре Сагу-60 с КД-приставкой 6001 в сдносантиметровых кюветах. Полученные спектры пересчитаны в единицах мелярного дихронзма (Λ_E).

Результаты и обсуждение. Свойства ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8. Содержание ГЦ-пар ДНК всех трех фагов оказалось равным (43± 1%). ГЦ-содержание определяли тремя независимыми методами: по значению температуры плавления ДНК, равной 72,3° в 0,1×SSC для всех образцов [16]; обработкой денатурационной кривой по методу Фельсенфельда [6, 12]; по спектрам КД, практически совпадающим с расчетной кривой для ДНК в В-форме с 43%-ным содержанием ГЦ-пар [7, 11].

Ширина интервала плавления, равная $5,1\pm0,5^{\circ}$ для ДНК трех фагов dp, свидетельствует об умеренно-вирулентном характере фагов, что согласуется с данными по лизогенизации этими фагами своего хозяина χ 89 S. derby [7, 8].



Рис. 1. Дифференциальная кривая плавления ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8.

ДКП ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8 также совпадают. На рис. 1 во избежание перегруженности графика приведена лишь одна усреднениая ДКП ДНК трех фагов, dp 1, 2, 8. Они соответствуют ДНК, богатой АТ-парами [7]. Поскольку ДКП отражает первичную структуру ДНК, а она уникальна, то ДКП является характеристикой каждой данной ДНК. Совпадение ДКП ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8 указывает на то, что в термодинамическом отношении эти ДНК одинаковы. Следовательно, в пределах чувствительности мстода тонкой структуры кривых плавления эти ДНК имеют идентичные последовательности оснований. Этот вывод согласуется с данными о тесном антигенном родстве фагов 4lp 1—dp 8, определенном серологически с помощью антифаговых сывороток [2].

200

Степень сглаженности ДКП дает возможность оценить истинный молекулярный вес ДНК [6]. ДКП ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8 схожа с кривой ДНК фага T 7 ($\sim 25 \times 10^6$ дальтон). По седиментационным данным, среднее значение молекулярного веса M_{\pm} для этих ДНК равно ($30,1\pm5,2$)×10⁶ дальтон. Как видно из совпадения значений молекулярных весов, определенных по форме дифференциальной кривой (истинного) и методом скороствой седиментации, молекулы ДНК фагов dp при выделении горячим фенольным методом почти не деградируют. Деградация наблюдалась у ДНК фага pi 16 с молекулярным весом $\sim 100 \times 10^6$ дальтон. Исходный молекулярный вес последней, оцененный по форме ДКП, оказался втрое больше величины, определенной методом ультрацентрифугирования [7]. Исходные молекулы фагов dp короче и при выделении не подвергаются деградации.

Свойства ДНК фага dp 9. Фаг dp 9, полученный из лизогенной культуры K 89 S. derby, являющейся хозяином фагов dp 1, dp 2, dp 8, имеет небольшое серологическое родство с известным сальмонеллезным фагом P 22 Salmonella typhimurium и общим с ним бактериальным хозяином—штаммом LT 2 Salmonella typhimurium. Молекулярный вес ДНК dp 9, определенный тремя независимыми методами, как и в случае с ДНК dp 1, dp 2, dp 8, оказался равным $(30,1\pm5,2)\times10^6$ дальтон. Интересно отметить, что фаги dp 1, dp 2, dp 8 и dp 9 имеют одинаковый латентный период (41-43 мин), одинаковый выход фага в полноценной среде и относятся к быстроадсорбирующимся фагам [2].

Что касается первичных структур ДНК dp 9 и dp 1, dp 2, dp 8, томежду ними имеется существенная разница. Как видно из рис. ! и 2, дифференциальные кривые плавления ДНК dp 9 и dp 1, dp 2, dp 8 заметно различаются. На интегральной кривой плавления (рис. 3) ДНК-



Рис. 2. Дифференциальная кривая плавления ДНК фага dp 9. Рис. 3. Интегральные крисые плавления ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8 (1) и dp 9 (2).

фага dp 9 имеется обособленная от остальной кривой «ступенька» в начале плавления, которая на дифференциальной кривой проявляется в виде острого пика шириной ~ 0,3°. Судя по температуре плавления этого пика, он соответствует выплавлению обогащенного АТ-парами участка (или участков) молекул. Существование такой легкоплавкой области, резкая асимметричность кривой плавления, а также то обстоятельство, что самый интенсивный пик на ДКП соответствует плавлению сильно обогащенных ГЦ-парами участков, обуславливают высокие значения Т_т (п ГЦ-содержания). В данном и подобных случаях параметр Т_т лишается физического смысла. Нельзя соответственно пользоваться и методом Мармура-Доти [16] для определения ГЦ-содержания ДНК. Оцененное двумя другими методами, ГЦ-содержание ДНК . dp 9 ~ 55%.

Ширина первого пика на ДКП ~ 0,3° соответствует плавлению участка, состоящего из ~ 400 пар нуклеотидов. Однако площадь этого пика составляет 3% площади всей ДКП. Следовательно, при этой температуре выплавляется не 400, а 1200 пар нуклеотидов, поскольку вся молекула ДНК с молекулярным весом 30×10⁶ дальтон состоит из 40000 пар нуклеотидов. Значит в первом пике выплавляется не один, а три участка по ~ 400 пар нуклеотидов каждый, обогащенные АТ-парами.

Наши результаты показали, что различия между фагами dp 9 и dp 1, 2, 8— на уровне различий в первичной структуре ДНК этих фагов—значительны, ≥ 100 пар нуклеотидов. Таким образом, различия между фагами dp 9 и dp 1, 2, 8, показанные ранее—морфология фаговой частицы, характер негативной колонии [2], различные константы тепловой инактивации,—по-видимому, обусловлены различиями в первичной структуре их ДНК.

Ширина интервала плавления (Δ T) ДНК фага dp 9 не может быть количественно определена. по той же причине, что и для T_m, но она явно больше, чем у ДНК фагов dp 1, dp 2, dp 8. Такая величина Δ T ха рактерна для ДНК умеренных фагов [10]. Истинно умеренный характер фага dp 9 в отличие от умеренно-вирулентных фагов dp 1, 2, 8 проявляется прежде всего в характере негативных колоний, образуемых им на газоне своего хозяина LT2 Salmonella typhimurium, и в прямой зависимости процента образования лизогенных бактерий от множественности инфекций.

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

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 11.XI 1979 г.

SALMONELLA DERBY ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՅԻ dp ԲԱԿՏԵՐԻՈՖԱԳԵՐԻ ԳՆԹ-Ի ՀԱԼՄԱՆ ԴԻՖԵՐԵՆՑԻԱԼ ԿՈՐԵՐԻ ԵՎ ԱՅԼ ՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԵՏԱՉՈՏՈՒՄԸ

Ուսումնասիրվել են dp 1, dp 2, dp 8 ֆագերի խմբի ԴնԹ-ների և dp-9 ֆագի ֆիզիկական ՀատկուԹյունները։ Ինչպես ցույց են տալիս մոլեկուլյար կշիռների մեծուԹյունները, շրջանային դիխրոիզմի պ սպեկտրների և Հատ-

802

կապես Հալման դիֆերենցիալ կորերի Համընկնումը dp 1, dp 2, dp 8 ԳՆԹների առաջնային և երկրորդային կառուցվածքը իդենտիկ են մենոդների։ դգայնունյան սաՀմաններում։ Ինչ վերաբերում է dp 9 ֆագի ԳՆԹ-ին, ապա ընդՀանուր Հատկունյունների Հետ մեկտեղ այն ունի նաև Հալման դիֆերենյիալ կոր, որը խիստ տարբերվում է dp 1, dp 2, dp 8 ԳՆԹ-ների կորերից։ Հստ մեկուսացած առաջին պիկի դիրքորոշման, լայնունյան և մակերեսի այն Համապատասխանում է dp 9 ԳՆԹ-ի ԱՏ- ղույգերով Հարուստ երեք Հատվածների Հալմանը։

COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENTIAL MELTING CURVES AND SOME PHYSICAL PROPERTIES OF DNA PHAGES OF SALMONELLA DERBY dp CULTURE

A. G. GABRIELIAN, N. A. ABLIAZIMOVA, M. K. VARTANIAN, K. S. KARAGIOZIAN, E. G. ZAKHARIAN, R. A. ZAKHARIAN

The coincidence, of molecular weights CD-spectra and especially differential curves of melting of DNAs dp 1, dp 2, dp 8 of near-relative phages of Salmonella derby indicates the identity of secondary and preliminary structures of these DNAs in within the sensitivity limits of the methods.

DNA of moderate phage dp 9 (LT-2 *S. typhimurinm*) has some common properties with DNAs dp 1, dp 2, dp 8, but at the same time it has quite different differential melting curve. Consequently the preliminary structures of dp 9 DNA considerably differ from those of DNA of dp 1, dp 2, dp 8.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Адамс М. Бактернофаги, М., 1961.
- 2. Вартанян М. К., Карабеков Б. П., Матевосян Н. А. Сб. Вопросы молекулярноклеточной биолсгии, Ереван, 1971.
- 3. Вартанян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биолог. ж. Армении, 31, 1, 8, 1978.
- 4. Вартанян М. К., Карабеков Б. П., Акопян С. М. Биолог. ж. Арменни, 27, 9, 1974.
- 5. Вартанян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биолог. ж. Арменин, 30, 9, 14, 1977.
- 6. Габриелян А. Г., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 31, 8, 833, 1978.
- 7. Габриелян А. Г., Захарян Р. А., Вартанзн М. К., Карагезян К. С. Биолог. ж. Армении. 32, 4, 1979.
- 8. Габрилович И. М. Основы бактермофагии. Минск, 1970.
- 9. Захарян Э. Г., Захарян Р. А., Чарчоглян А. А., Карагезян К. С., Африкян Э. К. Биолог. ж. Арменин, 31, 1, 3, 1978.
- 10. Лазуркин Ю. С Мол. биол., 11, 6, 1311, 1977.
- 11 Шляхтенко Л. С. Канд. дисс., М., 1974.
- 12. Felsenfeld G., Hirshman S. Z. J. Mol. Biol., 13, 4,7, 1965.
- 13. Freifeller D. J. Mol. Biol., 54, 557, 1970.
- 14. Layre E. Meth. Ensvm., 3, 447, 1957.
- 15. Lynbchenko Ju. L., Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A, V., Lazurkin Ju. S., Gause G. G. Biopolimers, 15, 1019, 1976.
- 16. Marmur J., Doty P. J. Mol. Biol., 5, 109, 1962.
- 17. McChetie L. A., Ritchie D. A., Thomas C. A. J. Mol. Biol., 23, 355, 1967.
- 18. Vizard D. L., Ansevin A. T. Biochemistry, 15, 741, 1976.

803