

чистой опыта проводился спектрофотометрически. После охлаждения раствора ДНК из буфера $0,1 \times \text{SSC}$ переводили гель-фильтрацией в буфер $0,02 \text{ M Na-ацетат} - 10^{-4} \text{ M ZnSO}_4$, pH 4,6, являющийся рабочим буфером для эндонуклеазы SI. Фрагментация молекул ДНК проводилась нуклеазой SI (фирма «Сигма»). Перед работой с эндонуклеазой SI проверяли ее активность [18]. Гидролиз проводили в водяной бане при температуре 51° . Реакционную смесь составляли растворы фиксированной глиоксальем ДНК и нуклеазы SI. Гидролиз останавливали добавлением буфера трис-ЭДТА, pH 9,3.

Контроль за временем реакции полного гидролиза проводился электрофоретически. Электрофорез разделенных на фрагменты молекул проводился в $0,5\%$ -ном агарозном геле в течение 6—10 ч при напряжении 20 в. Гели, окрашенные бромистым этидием, фотографировали через красный фильтр или сканировали. Интенсивность флуоресценции измеряли на сканирующем флуориметре конструкции А. С. Боровика (ИМГ АН СССР, Москва). Для градуировки подвижности фрагментов пользовались реперами с известными молекулярными весами—фрагментами расщепления ДНК фага T7 эндонуклеазой по фиксированным глиоксальем легкоплавким участкам, любезно предоставленными В. И. Лямичевым. Молекулярные веса фрагментов ДНК T7 следующие: $3,5 \times 10^6$, $8,2 \times 10^6$, $13,6 \times 10^6$ дальтон [15]; E. coRI—рестриктами ДНК трансдуцирующего фага $\lambda_{\text{rif 47 d}}$ (ДНК $\lambda_{\text{rif 47 d}}$ любезно предоставлена И. А. Басс). Молекулярные веса полученных нами рестрикт [6]: 8,65, 7,15, 5,65, 10 млн. дальтон. За единицу подвижности фрагментов ДНК брали подвижность фрагмента ДНК $\lambda_{\text{rif 47 d}}$ с низким молекулярным весом.

Результаты и обсуждение. Средневесовые молекулярные веса исследованных ДНК, полученные методом седиментации [2, 12], оказались равными 25×10^6 дальтон. Оцененный по степени сглаженности ДКП молекулярный вес обоих образцов ДНК [2—4] также оказался равным $(25-30) \times 10^6$ дальтон. На рис. 1, 2 приведены ДКП ДНК фагов др 9 и P 22. Приводятся кривые, усредненные машинным способом по нескольким независимым экспериментам.

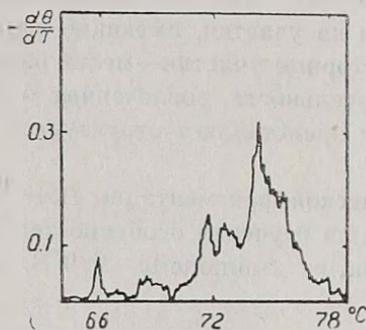


Рис. 1.

Рис. 1. Нормированная дифференциальная кривая плавления ДНК фага др 9 в $0,1 \times \text{SSC}$.

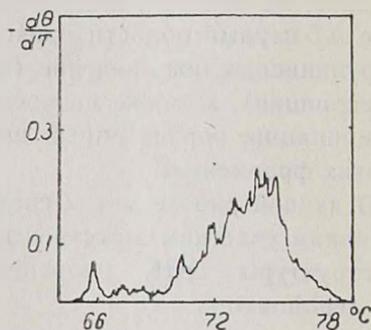


Рис. 2.

Рис. 2. ДКП ДНК фага P22.

ГЦ-содержание ДНК, определенное методом Фельсенфельда [11] и из отношения амплитуд спектров КД при двух длинах волн (275 нм и 245 нм) [3, 6], равно 55%. Ширина интервала плавления ДНК исследованных фагов, равная 6° , характерна для ДНК умеренных фагов. Вывод об истинно умеренном характере фагов др 9 и P 22 согласуется

с данными о лизогенизации штамма-хозяина. Частота лизогенизации для фагов $\phi r 9$ и P 22 штамма-хозяина *S. typhimurium* LT2 высокая и находится в прямой зависимости от множественности инфекции [1, 2].

Как видно из рис. 1, 2, на ДКП ДНК фагов $\phi r 9$ и P 22 имеется отдельный острый пик шириной в $0,3^\circ$, соответствующий плавлению обогащенного АТ-парами участка (или участков) молекул. Содержание АТ-пар в легкоплавких участках ДНК фагов $\phi r 9$ и P 22, определенное методом Фельсенфельда, равно 63% .

Оценка ширины и площади отделенного первого пика позволила предположить [2], что пик этот соответствует выплавлению трех участков молекул ДНК $\phi r 9$ и P 22, по 400 нуклеотидов каждый. Проверить это предположение возможно, применив методику фиксации расплавленных участков глиоксалем с последующим разрезанием их посредством нуклеазы SI, специфичной к однонитевым участкам [15]. Расплавленные участки были зафиксированы глиоксалем и при охлаждении не ренатурировали. После гидролиза нуклеазой SI фиксированных частично денатурированных препаратов ДНК был проведен электрофорез полученных фрагментов в агарозном геле. На рис. 3, 4 приведены флу-

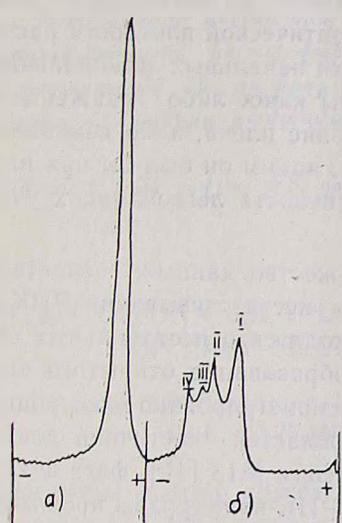


Рис. 3.

Рис. 3. Флуореграма агарозного геля с исходной нативной ДНК $\phi r 9$ (а) и с разделенными фрагментами ДНК $\phi r 9$ (б).

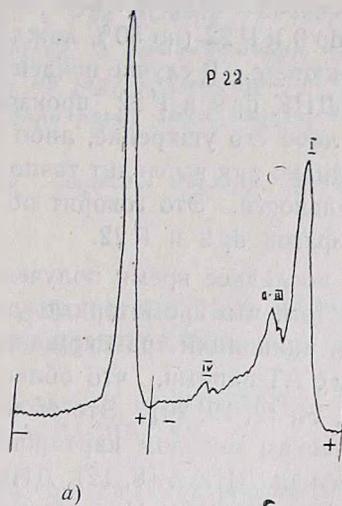


Рис. 4.

Рис. 4. Флуореграма агарозного геля с исходной нативной ДНК P 22 (а) и с разделенными фрагментами ДНК P 22 (б).

ореграммы столбиков $0,5\%$ -ного агарозного геля с исходной нативной (а) и фрагментированной (б) ДНК $\phi r 9$ и P 22. Высота пиков отражает интенсивность флуоресценции по длине геля. Для обеих ДНК действительно получаются по четыре двунитевых фрагмента, что подтверждает наше предположение о вырезании трех промежуточных легкоплавких участков.

Фрагменты, на которые легкоплавкие участки расщепляют молекулы, неодинаковы для ДНК фагов ϕ 9 и P 22. Молекулярные веса фрагментов, определенные с помощью электрофореза с реперами, оказались равными для ДНК ϕ 9 и P 22 соответственно 7,1; 6,4; 6,2; 5,8 и 6,8; 6,3 (дуплетная полоса), 5,5 млн. дальтон. Правые части ДКП ДНК ϕ 9 и P 22 (рис. 1, 2) различны, следовательно, ДНК ϕ 9 и P 22 отличаются распределением участков, богатых ГЦ-парами, по блокам. Таким образом, различия между этими фагами (морфология негативной колонии, фаговой частицы, цикл одиночного развития и выход фага), проявляющиеся на уровне первичной структуры их ДНК, улавливаются на ДКП.

Легкоплавкие участки в ДНК ϕ 9 и P 22, по-видимому, идентичны. Сомнение в идентичности этих участков могло возникнуть из-за некоторой неопределенности, проявляющейся в смещении начал плавления разных ДНК, которое обуславливается погрешностями в ионной силе раствора, в установлении начальной температуры на термостате и другими неточностями экспериментального характера, которые могут привести к сдвигу одной кривой относительно другой на $0,5^\circ$. Сомнение в идентичности исключил контрольный опыт по совместному плавлению ДНК ϕ 9 и P 22 (по 50% каждой по оптической плотности раствора) в одной кювете. В случае неидентичности начальных легкоплавких участков в ДНК ϕ 9 и P 22 произошло бы какое-либо искажение первого пика: либо его уширение, либо появление плеча, либо изменение высоты. Однако пик выглядит точно таким, каким он был бы при плавлении в отдельности. Это говорит об идентичности легкоплавких участков в ДНК фагов ϕ 9 и P 22.

В последнее время получено множество данных, свидетельствующих о том, что промоторные участки—места связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции—находятся в нестабильных областях, богатых АТ-парами, что облегчает образование открытого комплекса [8, 10, 14, 17, 19, 20]. Это было продемонстрировано электронномикроскопическим методом картирования областей частичной денатурации на примере ДНК λ [8, 12], ДНК колифага M13 [10], фага Ф 29 [15], генома фага T7 [13]. При связывании РНК-полимеразы происходит раскручивание двойной спирали, вследствие чего экспонируются матричные основания [17]. Следовательно, стабильность спирали в промоторной области—важный структурный фактор и указатель промоторной области. Необходимо, однако, отметить, что [19] высокое АТ-содержание—необходимый, но недостаточный признак специфического сайта инициации транскрипции. Связать легкоплавкие участки с промоторными последовательностями оснований позволит сопоставление физической и генетической карт ДНК P 22 и ϕ 9. Возможно, что в ДНК умеренных фагов АТ-богатые участки ответственны за интеграцию—эксицию. Анализ собственных и литературных данных позволяет предположить, что наличие участков, сильно обогащенных АТ-парами, кор-

релирует со способностью к интеграции, т. е. с умеренным характером фага.

Авторы благодарят Ю. С. Лазуркина и Ю. Л. Любченко за предоставление возможности для проведения работы и Л. С. Шляхтенко, Ю. А. Банникова за помощь в работе.

Институт экспериментальной биологии,
АН Армянской ССР

Поступило 25.II 1981 г.

ՀԵՇՏ ՀԱՎԻՈՂ ՄԱՍԵՐԻ ՖՐԱԳՄԵՆՏԱՑԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴՈՎ
Dp 9 և P22 ԲԱԿՏԵՐԻՈՖԱԳԵՐԻ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. Գ. ԴԱԲՐԻԵԼՅԱՆ, Զ. Ս. ՍԱՖԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ՍԱՖԱՐՅԱՆ, Մ. Կ. ՎԱՐԿԱՆՅԱՆ,
Ռ. Ա. ՋԱԶԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են սալմոնելային dp9 և P22 ֆագերի ԴՆԹ-ների հալման դիֆերենցիալ կորերը: Ըստ այդ կորերի ֆագերը չափավոր են: Երկու ԴՆԹ-ների մոլեկուլյար կշիռները (25×10^6 d) և ԳՑ գույզերի բաղադրությունները (55%) նույնն են: Հալված վիճակում գլիոքսալի միջոցով ֆիքսվել են ԴՆԹ-ի մոլեկուլների ԱՏ-դուլզերով հարուստ (63%) երեք հատվածներ:

Այդ հատվածները նույնատիպ են dp9 և P22 ֆագերի ԴՆԹ-ների մոտ: S1 էնդոնուկլեազայով կատարված հիդրոլիզը և ֆրագմենտների էլեկտրաֆորեզը ապացուցում են, որ իրոք մնացել են չորս երկպարուրանի հատվածներ, որոնք միմյանցից բաժանված են վերոհիշյալ հեշտ հալվող հատվածներով:

Քննվում է նաև տվյալ ԱՏ գուլզերով հարուստ մասերի ֆունկցիոնալ դերը:

STUDY OF DNA dp9 PHAGES AND P22 BY THE METHOD
OF EASY MELTED FRAGMENTATION

A. G. GABRIELIAN, Z. S. SAFARIAN, A. S. SAFARIAN,
M. K. VARTANIAN, R. A. ZACHARIAN

Differential melting curves of DNA dp9 and P22 phages with molecular weight 25×10^6 have been obtained. Melting curves have profiles of temperate phage melting curves. The agarose gel electrophoresis of partly melted DNA treated by glyoxal and endonuclease S1 shows that DNA dp9 and P22 are cleaved into four fragments with molecular weights 7,1; 6,4; 6,2; 5,8; and 6,8; 6,3; 5,5 million dalton.

The functional role of obtained AT-rich blocks in the structure of the temperate phages is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вартанян М. К., Карабеков Б. П., Матевосян Н. А. Сб. Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1970.

2. Габриелян А. Г., Аблязимова Н. А., Вартамян М. К., Карагезян К. С., Захарян Э. Г., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 33, 8, 799, 1980.
3. Габриелян А. Г., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 31, 8, 833, 1978.
4. Габриелян А. Г., Захарян Р. А., Вартамян М. К., Карагезян К. С. Биолог. ж. Армении, 32, 4, 357, 1979.
5. Лазуркин Ю. С. Мол. биол., 11, 6, 1311, 1977.
6. Миндалин С. Э., Ковалев Ю. Н., Кисер И. Ф., Данилевская О. Н., Горленко Ж. М., Гуревич А. И., Аваков А. Э. Генетика, 15, 1543, 1979.
7. Шляхтенко Л. С. Канд. дисс., М., 1974.
8. Botchan P. J. Mol. Biol., 105, 161, 1976.
9. Galos M. P., Johnsrud P., Miller J. Cell, 13, 411, 1978.
10. Das Gupta S., Allisch D. P., Snyder C. E., Mitro S. J. Biol. Chem., 252, 5916, 1977.
11. Felsenfeld G., Richman S. Z. J. Mol. Biol., 13, 407, 1965.
12. Freirelder D. J. Mol. Biol., 54, 567, 1970.
13. Jones B. B., Chan H., Rothstein S., Wells R. D., Resnikoff W. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 74, 4914, 1977.
14. Koller Th., Kubler O., Portman R., Sogo J. M. J. Mol. Biol., 120, 121, 1978.
15. Pavlov V. M., Lyubchuko Yu. S., Borovik A. S., Lazurkin Yu. S. Nucl. Acid. Res., 44053, 1977.
16. Sogo J. M., Rodeno P., Koller Th., Vinuela F., Salas M. Nucl. Acids Res., 7, 107, 1979.
17. Siebenbeilist U. Nature, 279, 5714, 1979.
18. Vogt V. M. J. Biochem., 33, 192, 1973.
19. Vollenweider H. J., Flandi M., Szybalski W. Science, 205, 503, 1979.
20. Vollenweider H. J., Szybalski W. J. Mol. Biol., 123, 485, 1978.
21. Wada A., Yabuki S., Husimi. Crit. Rev. Biochem., 1, 1978.