

В. Т. Соловьян

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК ЭУКАРИОТ В ИНВЕРТИРУЕМОМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ. СВОЙСТВА ДИСКРЕТНЫХ ФРАГМЕНТОВ

Исследованы некоторые физико-химические свойства дискретных фрагментов, выявляемых при фракционировании лизированных ядер *Crepis capillaris* электрофорезом в инвертируемом электрическом поле. Показано, что крупные ДНК-фрагменты способны селективно распадаться на мелкие под влиянием физических и химических агентов, а также проявлять аномальную подвижность в присутствии интеркалятора бромистого этидия.

Предполагается, что данные свойства могут быть связаны с наличием липких концов, фланкирующих ДНК-фрагменты, позволяющих образовывать топологически замкнутые и мультимерные структуры.

Ранее мы представили данные, показывающие, что при фракционировании ядерных ДНК в инвертируемом электрическом поле появляется набор дискретных фрагментов (ДФ), представляющих собой, вероятно, различные фрагменты хромосом, унифицированные по размеру (см. Биополимеры и клетка, 1990, № 3, с. 97—99).

В настоящем сообщении приведены результаты, касающиеся физико-химических свойств дискретных фрагментов.

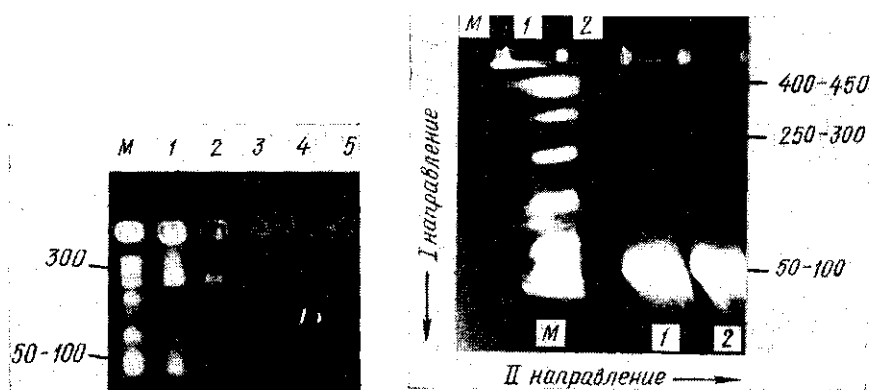


Рис. 1. Селективный распад дискретных фрагментов при физических воздействиях. Ядра культивируемых клеток *C. capillaris* (1) лизировали и фракционировали, как описано в тексте. Агарозные блоки, содержащие ДНК-фрагменты размером 250—300 (2) и 50—100 (3) т. п. н., вырезали и рефракционировали в тех же условиях; 4, 5 — те же фрагменты размером соответственно 250—300 и 50—100 т. п. н., рефракционированные после УФ-облучения («ЛКВ», MacroVue, 1 мин). М — маркеры молекулярных масс: конкатамеры фага λ . Размеры фрагментов здесь и далее даны в т. п. н.

Fig. 1. Selective disintegration of discrete DNA-fragments under some physical influences. Nuclei of *C. capillaris* cultivated cells were fractionated by FIGE (line 1). Agarose blocks containing DNA-fragments were cut and re-fractionated under the same conditions (lines 2 and 3). Lines 4 and 5 — the same blocks after UV-irradiation (LKB, MacroVue, 1 min). M — lambda oligomers

Рис. 2. Двухмерный гель-электрофорез в инвертируемом электрическом поле ДНК растения (1) и культивируемых клеток (2) *R. serpentina*. ДНК фракционировали, как описано в тексте. Гель поворачивали на 90° и фракционировали в тех же условиях в присутствии 20 %-ного формамида; М — конкатамеры фага λ .

Fig. 2. Two-dimensional FIGE of nuclear DNA from intact plants (1) and cultured cells (2) of *R. serpentina* DNA was fractionated by FIGE, gel was turned for 90° and continued to be fractionated under the same conditions in the presence of 20 % formamide. M — lambda oligomers

Препараты ядерных ДНК из интактного растения и культивируемых клеток *Crepis capillaris* и *Rauwolfia serpentina* получали, как описано в вышеуказанной работе. Лизированные препараты фракционировали с помощью электрофореза в инвертируемом электрическом поле в

постоянном режиме инверсии (24 с «вперед» и 8 с «назад») в $0,5 \times$ ТВЕ-буфере при градиенте напряжения 10 В/см на протяжении 18 ч.

Из рис. 1 следует, что крупные ДФ способны селективно распадаться на мелкие фрагменты под воздействием УФ-облучения. К такому же эффекту приводит обработка крупных ДФ другими физическими факторами (замораживание в жидком азоте или расплавление блоков легкоплавкой агарозы при 65°C). Мелкие ДНК-фрагменты, размер которых составляет ~ 50 — 100 т. п. н., при этом не распадаются.

Представленные на рис. 2 результаты двухмерного пульс-электрофорезного фракционирования в присутствии 20 %-формамида во II направлении свидетельствуют о том, что крупные ДФ состоят из мелких, соединенных слабыми связями.

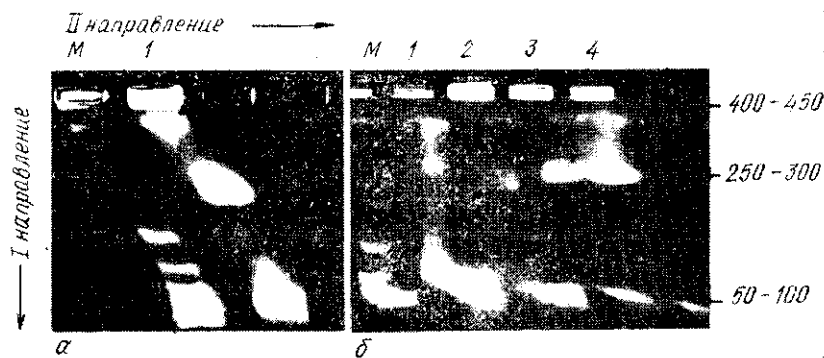


Рис. 3. Двухмерный гель-электрофорез в инвертированном электрическом поле ДНК растения (*I*) и различных линий культивируемых клеток *C. capillaris* (2—4). Относительная подвижность ДНК-фрагментов (т. п. н.) по отношению к соответствующему конкатимеру фага λ составляет соответственно дорожкам: *a*—1,2 (50—100); 1,3 (250—300); 1 (400—450); *b*—2, 3, 3, 3 (50—100); 1, 1, 1, 1 (250—300); 1, 1, 1, 1 (400—450). Концентрация бромистого этидия 1 (*a*) и (*b*) мкг/мл во II направлении

Fig. 3. The anomalous mobility of discrete DNA-fragments in the presence of ethidium bromide. DNA from intact plants (*I*) and various cultured cell lines of *C. capillaris* (2—4) were fractionated by two-dimensional FGE. Panel A—1 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide in the second dimension; Panel B—5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide in the second dimension.

Данные, приведенные на рис. 1 и 2, позволяют высказать предположение, что крупные ДФ являются производными (возможно, мультимерными) формами фрагментов, соединенных слабыми, вероятней всего, водородными связями.

Из рис. 3 видно, что дискретные фрагменты способны проявлять аномальную подвижность в присутствии бромистого этидия, причем величина ее зависит от концентрации интеркалятора. Это может означать, что дискретные фрагменты способны образовывать топологически замкнутые структуры.

Нельзя не отметить, что свойства дискретных фрагментов, обнаруженные нами, напоминают свойства ДНК фага λ . Последнее обстоятельство позволяет высказать предположение о том, что ДФ фланкированы липкими концами, позволяющими образовывать мультимерные или кольцевые структуры.

THE FRACTIONATION OF EUKARYOTIC DNA BY FIELD INVERSION GEL ELECTROPHORESIS. PROPERTIES OF DISCRETE FRAGMENTS

V. T. Solovyan

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Some properties of discrete DNA-fragments appearing during the fractionation of *Crepis capillaris* lysed nuclei by FIGE are investigated. It is shown that large DNA-fragments have a capacity to selective disintegration into small ones under physical and chemical influences and are able to anomalous mobility in the presence of intercalator ethidium bromide.

It is supposed that discrete DNA-fragments are flanked by sticking ends permitting them to form multimeric and topologically integrated structures.

УДК 577.112.5+578.841

Н. В. Роднин, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, Э. А. Козлов

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, *AGROTIS SEGETUM* ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

Полипептидная цепь гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum*, реконструирована на основании данных по строению и составу триптических и хмотриптических пептидов немодифицированного белка, триптических фрагментов малеил-белка и хмотриптических пептидов одного из малеил-фрагментов. Полипептидная цепь построена из 247 остатков аминокислот и имеет молекулярную массу 29135. Обсуждаются особенности реконструкции полипептидной цепи данного белка, связанные с его расщеплением протеазой гранул.

Введение. Бакуловirusы подразделяются на две серологически родственные группы, различающиеся по форме тел включения (ТВ): А — вирусы ядерного полиэдрома (ВЯП, форма ТВ — многогранники) и В — вирусы гранулеза (ВГ, ТВ овальной формы). Распространение бакуловirusов в природных популяциях насекомых в значительной степени зависит от белка ТВ, защитный супервириокапсид из которого предохраняет вирус от воздействий среды при передаче его от насекомого к насекомому. Инфекционность вируса в значительной мере определяется способностью ТВ растворяться в кишечнике личинок насекомых. Этот процесс идет при участии протеазы ТВ [1]. В течение ряда лет нами была определена первичная структура нескольких полиэдринов (белок полиэдров) ряда ВЯП [1], а также изучены взаимоотношения протеазы полиэдров с белком ТВ [1—3]. То обстоятельство, что протеаза ТВ и ее естественный субстрат (белки ТВ) находятся в комплексе, значительно затрудняет выделение нерасщепленного белка и исследование его первичной структуры.

Если в группе А бакуловirusов известны первичные структуры десяти белков ТВ [1, 4, 5], выясненные как путем определения аминокислотной последовательности белка, так и секвенированием соответствующих генов, то в группе В бакуловirusов к настоящему моменту просеквенированы лишь гены гранулинов *Trichoplusia ni* и *Pieris brassicae* [7]. В данном сообщении подробно описан принцип реконструкции полипептидной цепи гранулина ВГ *A. segetum* на основании опубликованных нами ранее данных по составам и строению триптических и хмотриптических пептидов восстановленного и карбоксиметилированного гранулина [8] и триптических фрагментов малеил-гранулина

© Н. В. РОДНИН, Т. Л. ЛЕВИТИНА, Н. М. ГУСАК, Э. А. КОЗЛОВ, 1991