

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК ЭУКАРИОТ В ПУЛЬСИРУЮЩЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ I. ОБНАРУЖЕНИЕ ДИСКРЕТНЫХ ГЕНОМНЫХ ФРАГМЕНТОВ

С помощью электрофоретического фракционирования ДНК эукариот в инвертируемом электрическом поле показано наличие дискретных геномных фрагментов. Набор фрагментов однотипен для различных представителей эукариот и представляет собой гетерогенную популяцию молекул ДНК, унифицированных по размеру.

В 1983 г. Шварц и др. [1] сообщили об электрофоретической системе с периодически изменяющимся направлением прикладываемого поля, позволяющей разделять более крупные молекулы ДНК по сравнению с обычной гель-электрофорезной техникой.

К настоящему времени разработаны различные системы электрофореза в пульсирующем поле, позволяющие разделять ДНК от нескольких тысяч до 10^6 пар оснований (п. о.) (см. [2]).

Они с успехом были применены для изучения многих, прежде не охарактеризованных молекул ДНК, включая интактные хромосомные ДНК дрожжей и различных представителей *Protozoa* [3].

В настоящем сообщении мы приводим результаты фракционирования ДНК эукариот с помощью гель-электрофореза в инвертируемом электрическом поле.

Материалом исследования служили печень крысы, интактные растения и полученные из них культивируемые клетки.

Препараты ядер получали по методу [4] с некоторыми модификациями. Грубый осадок ядер получали, гомогенизируя материал в буфере А (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,3 М маннитол, 0,1 % БСА (V фракция), 4 мМ 2-меркаптоэтанол) на холоду. После фильтрования гомогената и центрифугирования (1 000 g, 15 мин, 2 °С) осадок ядер ресуспендировали в среде для выделения и насаивали на 2,2 М сахарозную подушку, приготовленную на буфере В (50 мМ трис-НСl, 10 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, рН 8,0).

После центрифугирования (80·10³ g, 2 ч, 2 °С) осадок очищенных ядер промывали буфером С (буфер В, содержащий 0,4 М сахарозу) и смешивали с равным объемом 1 %-ной легкоплавкой агарозы, приготовленной на ТЕ-буфере при 40 °С (ТЕ-буфер содержит 10 мМ трис-НСl, 1 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, рН 8,0).

Суспензию ядер разливали в плоские формы толщиной 2 мм, охлаждали до получения геля и насаивали равный объем лизирующего буфера (1 %-ный саркозилат Na, приготовленный на ТЕ-буфере). Лизис заплавленных в агарозу ядер проводили при 55 °С в течение 1 ч.

ДНК лизированных ядер фракционировали при помощи гель-электрофореза в инвертируемом электрическом поле в 0,5×ТВЕ-буфере в течение 20—24 ч при градиенте напряжения 10 В/см.

Соотношение длительности импульсов «вперед» / «назад» составляло 3 / 1.

В качестве маркеров молекулярных масс использовали конкатамеры фага λ , приготовленные по [5], и интактные хромосомы *Saccharomyces cerevisiae* [6].

При фракционировании ДНК использовали два режима инверсии электрического поля: «А» — режим включал постоянное пульсирование электрического поля (24 с «вперед» и 8 с «назад»), при «В»-режиме период пульсирования непрерывно увеличивался от 1,5 до 360 с в направлении «вперед» и от 0,5 до 120 с в направлении «назад».

Результаты фракционирования, представленные на рис. 1, показывают, что ДНК эукариот образует ряд дискретных фрагментов. Набор фрагментов однотипен для различных представителей эукариот, использованных нами, и напоминает набор фрагментов ДНК дрозофилы, обнаруженный ранее [7].

Паттерн ДНК-фрагментов, напоминающий лесенку с шагом ~ 150 кВ, не является артефактом пульс-электрофорезного фракционирования, поскольку при рефракционировании агарозных блоков, содержащих отдельные дискретные фрагменты, каждый из них занимает положение, соответствующее своему Rf (результаты не представлены). Решающим условием, приводящим к появлению дискретных фрагментов, является обработка заплавленных в агарозу ядер лизирующим агентом или протениазой К (рис. 2).

Универсальное распределение и высокое содержание (от 10 до 50 % ДНК, остав-

шейся на старте) предполагает, что дискретные ДНК-фрагменты не являются экстра-хромосомной ДНК.

Рестрикционный анализ выделенных фрагментов, а также блот-гибридизация их с рестрицированной суммарной ДНК обнаруживает шлейф, характерный для хромосомной ДНК. В то же время рестрикционный анализ хлоропластной и митохондриаль-

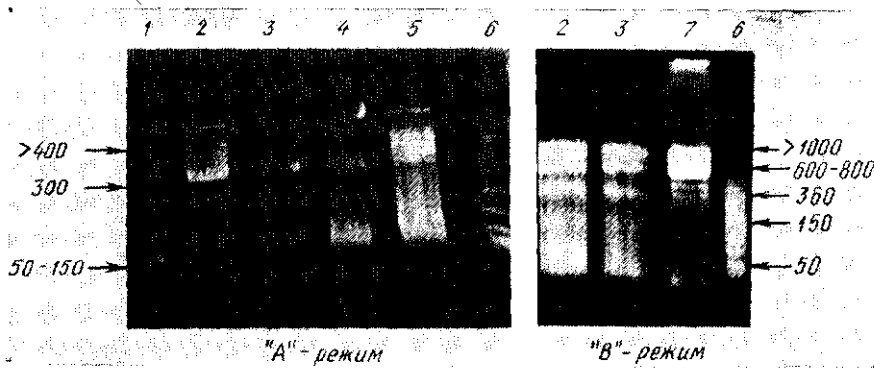


Рис. 1. Фракционирование ядерных ДНК в инвертируемом электрическом поле: листья (1) и культивируемые клетки (2) *Crepis capillaris*; листья *Nicotiana tabacum* (3); *Rauwolfia serpentina* (4); печень крысы (5); конкатамеры фага λ (6); хромосомы *Saccharomyces cerevisiae* (7). Размеры фрагментов даны в т. п. о.

Fig. 1. The fractionation of nuclear DNA by field inversion gel electrophoresis: the leaves (1) and cultured cells (2) *Crepis capillaris*; leaves *Nicotiana tabacum* (3), *Rauwolfia serpentina* (4), the rat liver (5); lambda oligomers (6); chromosomes *Saccharomyces cerevisiae* (7).

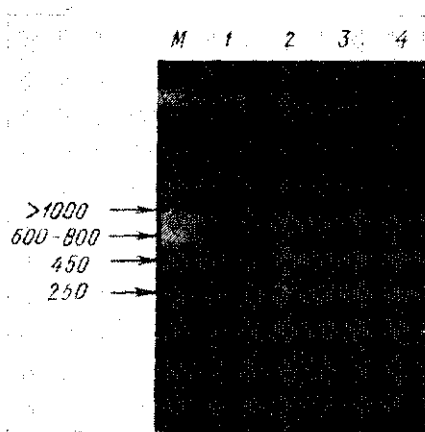


Рис. 2. Факторы, приводящие к появлению дискретных фрагментов. На заглавленные в агарозу ядра *C. capillaris* насланвали 20 мМ EDTA (1); 20 мМ EDTA + протеиназа К (200 мкг/мл (2)); 20 мМ EDTA + 1 % саркозилат Na (3); 20 мМ EDTA + 1 % саркозилат Na + протеиназа К (4); инкубировали сутки при 55 °С и фракционировали в режиме «В»; М — хромосомы *S. cerevisiae*. Размеры фрагментов даны в т. п. о.

Fig. 2. Factors leading to the appearance of discrete fragments. Agarose blocks containing isolated nuclei *Crepis capillaris* were incubated with: 20 mM EDTA (1); 20 mM EDTA + proteinase K (200 μ g/ml, 2); 20 mM EDTA + 1 % Sarkosyl (3); 20 mM EDTA + proteinase K + 1 % Sarkosyl (4) for 24 h at 55 °C and fractionated in «B» regime. M — chromosomes *S. cerevisiae*

ной ДНК растений, размер которых находится в пределах 120—220 кВ [8], обнаруживает хорошо различимый набор рестрикционных фрагментов (результаты не представлены).

Вышеизложенное предполагает, что дискретные фрагменты ДНК эукариот, обнаруживаемые с помощью пульс-электрофорезного фракционирования, представляют собой набор различных хромосомных ДНК, имеющих одинаковый размер.

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

V. T. Solovyan, V. A. Kunakh

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

Summary

The fractionation of eukaryotic DNA by the field inversion gel electrophoresis results in the set of discrete fragments. The pattern of discrete fragments is similar to different members of eukaryotes under study and involves the various chromosomal size-uniform DNAs.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging* / D. C. Schwartz, W. Safran, J. Welsh et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1983.—47.—P. 189—195.
2. *Pulsed field gel electrophoresis* / E. Lai, B. W. Birren, S. M. Clark et al. // BioTechnique.—1989.—7, N 1.—P. 34—42.
3. *Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field* // G. F. Carle, M. Frank, M. V. Olson et al. // Science.—1986.—232, N 4746.—P. 65—68.
4. *Smith H. S., Berezney R. Nuclear matrix-bound deoxyribonucleic acid synthesis: an in vitro system* // Biochemistry.—1982.—21, N 26.—P. 6752—6771.
5. *High-resolution separation and accurate size determination in pulsed gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and effect of agarose and temperature* / M. K. Mathew, C. L. Smith, C. R. Cantor et al. // Ibid.—1988.—27, N 26.—P. 9204—9210.
6. *A simple and rapid method for preparing yeast chromosomes for pulsed field gel electrophoresis* / M. Bellis, M. Pages, G. Roizes et al. // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 16.—P. 6749.
7. *Чуриков И. А., Анащенко В. А., Бериташвили Д. Р. Обнаружение гигантских внехромосомных ДНК, содержащих мобильные гены дрозофилы* // Докл. АН СССР.—1987.—296, № 2.—С. 457—459.
8. *Extranuclear genes* / P. Borts, H. F. Tabak, L. A. Grivell et al. // Eukaryotic genes: struct. activ. and regul.—London, etc.: Acad. press, 1983.—P. 71—84.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 22.11.89

УДК 577.152.94.088.3:579.852.11

© Т. В. Сорочинская, С. И. Черных,
Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, 1990

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА β-ЛАКТАМАЗЫ TEM-1 Escherichia coli

Разработана система суперсинтеза фермента β-лактамазы в клетках E. coli по фаговирусной технологии. Это позволило получить фермент в количестве (1—2)·10⁶ ед. активности в 1 мл культуральной жидкости. Предложен метод препаративного выделения β-лактамазы, значительно упрощенный по сравнению с известными ранее. Выход препарата составляет 45 % исходного количества фермента в культуральной жидкости. Препарат ферментически гомогенен и для использования в иммуноферментном анализе в дальнейшей очистке не нуждается.

Введение. В последнее время в различных областях медицинских и биологических исследований широкое применение получил иммуноферментный анализ (ИФА). Многочисленные модификации ИФА предполагают использование конъюгатов — комплексов энзима и фермента или антигена и фермента. Наиболее распространенными ферментами для конструирования конъюгатов являются щелочная фосфатаза, пероксидаза, β-галактозидаза [1]. Наряду с этими ферментами в настоящее время начинают использовать β-лактамазу [2]. По своим физико-химическим свойствам этот фермент с молекулярной массой 28 500 удобен в работе, поскольку представлен одной субъединицей и термостабилен. Конъюгаты на основе β-лактамазы имеют ряд преимуществ перед традиционными, а по чувствительности они сравнимы [3]. Прежде всего необходимо отметить простоту детекции при использовании конъюгатов на основе β-лактамазы. Концентрация реагента, применяемого для протекания реакции, позволяет визуально регистрировать результаты анализа. По своему химическому составу реагент крайне прост, доступен и представляет собой смесь пенициллина, крахмала и йода в водном растворе KI, к тому же он не токсичен. Большинство других субстратов для индикации иммобилизованных ферментов, в частности ОФД для пероксидазы хрена, токсичны, канцерогенны [4], обладают низкой стабильностью и синтез их затруднен. Конъюгаты на основе β-лактамазы довольно стабильны — при оптимальных условиях хранения их активность сохранялась не менее 18 месяцев [3].

Разработка и создание диагностикумов с применением конъюгатов на основе β-лактамазы требует высокоочищенного фермента. Для обеспечения значительных коли-