

11. *Pro-opiomelanocortin gene: a model for negative regulation of transcription by glucocorticoids* / J. Drouin, J. Charron, J. P. Garner et al. // *J. Cell. Biochem.*—1987.—35, N 4.— P. 293—304.
12. *Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor a specific binding sequence within the receptor cDNA clone* / S. Okret, L. Poellinger, Y. Dong, J.-A. Gustafsson // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 16.— P. 5899—5903.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск

Получено 10.05.90

УДК 578.821.51:578.5:577.217.33

А. И. Муравлев, Н. А. Чикаев, Н. А. Нетесова, Н. В. Чешенко,
А. Б. Беклемишев, Н. П. Мертвецов

ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ мРНК С ПОМОЩЬЮ АНТИСЫВОРОТКИ К БЕЛКУ р35 ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ И КАРТИРОВАНИЕ ГЕНА БЕЛКА р35

Проведено иммунохимическое выделение специфической мРНК из клеток, инфицированных вирусом осповакцины (ВОВ), с помощью антисыворотки к белку р35 оболочки вириона. Показано, что кДНК, синтезированная на этой мРНК, специфически гибридизуется с геном, расположенным на левом плече HindIII А-фрагмента вирусной ДНК.

Введение. Вирус осповакцины (ВОВ) в настоящее время широко используется для экспрессии чужеродной генетической информации в эукариотических клетках [1]. Актуальной в этой связи является проблема структурно-функционального исследования генома вируса и, в частности, проблема картирования его структурных белков. Для ее решения используют несколько довольно сложных и трудоемких методических подходов. Это, прежде всего, гибридизационная селекция суммарной вирусной мРНК на фрагментах геномной ДНК ВОВ с последующим иммунохимическим анализом продуктов ее бесклеточной трансляции [2—5]; клонирование интересующих участков генома ВОВ в экспрессирующие бактериальные векторы и идентификация получаемых при этом белковых вирусспецифических продуктов [6, 7], а также иммунохимический скрининг экспрессирующих бактериальных «библиотек» геномной вирусной ДНК [8—10]. Несмотря на существенные различия, все эти подходы включают в себя использование либо моноспецифических антисывороток, либо моноклональных антител к структурным белкам ВОВ.

Ранее нами описано получение трех антисывороток к мажорному белку оболочки ВОВ р35 [11]. Далее с их помощью был проведен иммунопреципитационный анализ продуктов бесклеточной трансляции суммарной вирусспецифической мРНК [12].

В данной работе осуществлено иммунохимическое выделение мРНК с помощью одной из антисывороток к белку р35 оболочки вириона ВОВ и проведен анализ локализации вирусного гена, гибридизующегося с этой мРНК.

Материалы и методы. В работе использовали ВОВ штамма Л-ИВП, культуру клеток CV-1 (из коллекции НПО «Вектор», Новосиб. обл.); ¹²⁵I меченный белок А из клеток *Staphylococcus aureus* с удельной активностью 2·10⁷ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹, РНК-зависимую ДНК-полимеразу из вируса миелобластома птиц (производство НПО «Вектор», Новосиб. обл.); [³²P] меченные нуклеозидтрифосфаты с удельной активностью 10⁶ ББк/ммоль (ПО «Радиофармацевтика», Ташкент); эндонуклеазы рестрикции (произ-

© А. И. МУРАВЛЕВ, Н. А. ЧИКАЕВ, Н. А. НЕТЕСОВА, Н. В. ЧЕШЕНКО,
А. Б. БЕКЛЕМИШЕВ, Н. П. МЕРТВЕЦОВ, 1990

водство НПО «Фермент», Вильнюс): хитиназу (1,4-β-(2-ацетамид-2-деокси-D-глюкозид)гликаногидролаза) с удельной активностью 2,5 ед/мг («Sigma», США). Ванадилрибонуклеозидные комплексы синтезированы и любезно предоставлены для этой работы И. А. Назаренко (Новосиб. гос. ун-т).

Культивирование и очистка ВОВ, фракционирование его белков, получение и анализ специфических антисывороток, методики электрофореза белков и радиоиммуноанализа описаны ранее [11, 12].

Для выделения специфической мРНК осадок инфицированных клеток ресуспендировали в буфере (0,25 М сахараза, 0,025 М трис-НСl, рН 8,6; 0,05 М КСl, 0,005 М MgCl₂, 0,01 М ванадилрибонуклеозидные комплексы (ВРК), 1 % тритон X-100), инкубировали смесь 5 мин при 0 °С и центрифугировали 15 мин при 3 000 g. К супернатанту добавляли КСl до конечной концентрации 0,15 М, гепарин — до 1 мг/мл и наслаивали его на трехступенчатый градиент сахаразы следующего состава: 1-я ступень — 1,8 М сахараза, 0,025 М трис-НСl, рН 8,6, 0,1 М КСl, 0,001 М MgCl₂, 0,01 М ВРК, 0,1 % тритон X-100; 2-я ступень — 1 М сахараза, 0,025 М трис-НСl, рН 8,6, 0,1 М КСl, 0,005 М MgCl₂, 0,01 М ВРК, 0,1 % тритон X-100, 1 мг/мл гепарина, 1/20 часть объема — антисыворотка; 3-я ступень — 0,5 М сахараза, 0,025 М трис-НСl, рН 8,6, 0,1 М КСl, 0,005 М MgCl₂, 0,01 М ВРК, 1 % тритон X-100. Полученный градиент центрифугировали в течение 17 ч при 100 000 g при 4 °С. Осадок полностью растворяли в буфере (0,01 М трис-НСl, рН 8,6, 0,15 М NaCl, 0,003 М MgCl₂, 0,002 М ВРК, 0,1 % тритон X-100) и добавляли к раствору суспензию белок А-сефарозы 4В. Инкубировали смесь в течение 2 ч при 4 °С и постоянном перемешивании. После этого гранулы сефарозы осаждали центрифугированием и промывали их 3 раза по 15 мин буфером для растворения полисом. РНК элюировали буфером (0,2 М трис-НСl, рН 7,2, 2 % DS-Na, 0,02 М ЭДТА, 0,15 М NaCl). Элюат дважды обрабатывали фенолом, насыщенным 0,1 М трис-НСl, рН 7,2. К водной фазе добавляли тРНК до концентрации 20 мкг/мл и 2,5 объема этанола. Полученный препарат РНК еще 2 раза переосаждали этанолом и использовали для синтеза [³²P] меченой кДНК [13].

Геномную ДНК ВОВ выделяли из очищенного вируса экстракцией смесью фенол — хлороформ [14]. [³²P] меченую кДНК гибридизовали с рестриктами вирусной ДНК, иммобилизованными на нитроцеллюлозном фильтре после разделения их электрофорезом в 0,6 %-ном агарозном геле, а также с клонированными в плазмидном векторе фрагментами ДНК ВОВ [13].

Фрагменты вирусной ДНК клонировали стандартными методами, используя в ряде случаев синтетические линкеры и адапторы [13].

Белок *p35*, выделенный электрофоретически из пластины полиакриламидного геля [11], обрабатывали препаратом хитиназы в концентрации 1 мкг/мл в буфере (0,01 М трис-НСl, рН 9,0, 0,1 % DS-Na) при 20 °С в течение 1 ч. Перед внесением в реакционную смесь раствор хитиназы обрабатывали в течение 5 мин 0,001 М диизопропилфторфосфатом (ДФФ).

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано, что из трех антисывороток к белку *p35* с продуктами бесклеточной трансляции вирусной мРНК взаимодействует лишь антисыворотка АС35(ВЭМ), причем преципитируемый ею полипептид имеет молекулярную массу (м. м.) 27 000 [12]. Поэтому для получения специфической мРНК была использована именно эта антисыворотка, а в качестве контроля — сыворотка неиммунизированного кролика. мРНК выделяли из 2 · 10⁸ клеток CV-1, взятых на 7-м ч инфекционного цикла. Поскольку все процедуры осуществляли в присутствии ванадилрибонуклеозидных комплексов, имеющих сильное поглощение при 260 нм, количество выделенной РНК не определяли. Половину ее использовали для синтеза [³²P]меченой кДНК. В случае РНК, выделенной с помощью АС35(ВЭМ), включение [³²P]ТТФ в кДНК составило ~3 · 10⁵ имп/мин (счет по Черенкову). В случае неиммунной сыворотки включение радиоактивной метки на уровне фона (~10³ имп/мин).

Активности полученного [³²P]меченого зонда оказалось достаточно для осуществления гибридизационного анализа ДНК ВОВ. Из данных рис. 1 видно, что кДНК гибридизуется только с *HindIII* А-фрагментом вирусной ДНК, имеющим длину 45 тыс. нуклеотидных пар (н. п.).

Ранее нами было показано, что вирусспецифическая мРНК, гибридизующаяся с левым *HindIII*-*SalGI*-субфрагментом *HindIII* А-фрагмента размером 2,5 тыс. п. о., направляет в белоксинтезирующей системе среди прочих синтез полипептида с м. м. ~27 000. Этот полипептид по электрофоретической подвижности совпадает с продуктом трансляции суммарной вирусной мРНК, взаимодействующим с антисывороткой АС35(ВЭМ) [15]. Синтез такого же полипептида, хотя и

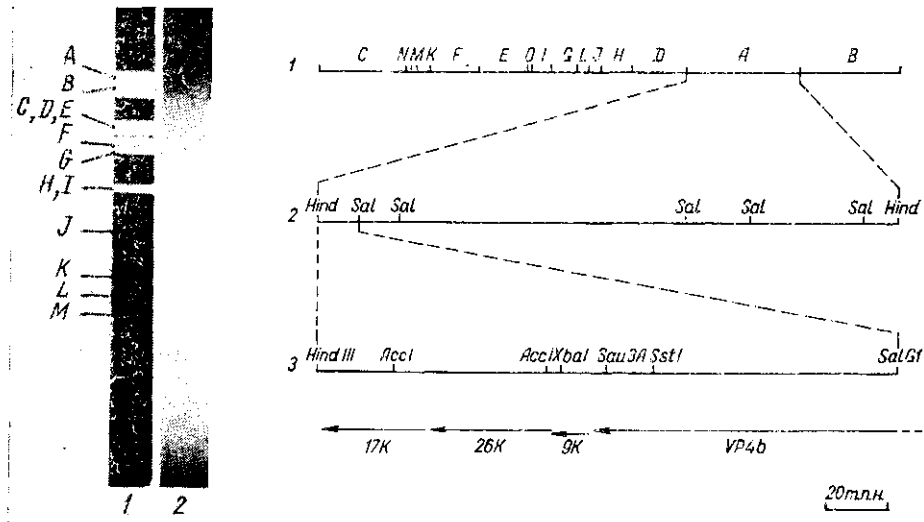


Рис. 1. Гибридизация специфической [^{32}P] меченой кДНК с *HindIII*-рестриктами ДНК ВОВ штамма Л-ИВП: 1 — электрофореграмма *HindIII*-рестриктов; 2 — радиоавтограф гибридизации

Fig. 1. Hybridization of the specific [^{32}P]-labelled cDNA to vaccinia DNA *HindIII* fragments (strain L—IVP). 1.— electrophoregram of *HindIII* fragments; 2.— autoradiogram of the hybridization.

Рис. 2. Рестрикционные карты ДНК ВОВ штамма WR [16]: 1 — карта *HindIII*-фрагментов вирусной ДНК; 2 — карта *SalGI*-субфрагментов *HindIII*-А-фрагмента ДНК ВОВ; 3 — левый *HindIII*-А-*SalGI*-фрагмент ДНК ВОВ

Fig. 2. Restriction maps of vaccinia DNA (strain WR) [16] 1.— the map of vaccinia DNA *HindIII* fragments; 2.— the map of *SalGI* subfragments of the vaccinia DNA *HindIII* A-fragment; 3.— the left *HindIII* A-*SalGI* fragment of the vaccinia DNA.

в гораздо меньшей степени, наблюдался на мРНК, гибридизующейся с *HindIII* К-фрагментом ДНК штамма Л-ИВП, который идентичен *HindIII* J-фрагменту штамма WR (данные не приведены). Первичная структура левого *HindIII* А-*SalGI*-фрагмента ДНК ВОВ опубликована в литературе [16]. В этой структуре обнаружены три левонаправленные открытые рамки считывания, способные кодировать белки с м. м. 9 000, 17 000, 26 000 (гены 9К, 17К, 26К соответственно), а также конец прокартированного ранее гена белка *VP4b* (рис. 2). Мы предположили, что ген 26К соответствует гену белка *p35*. Для проверки этой гипотезы левый *HindIII* А-*SalGI*-фрагмент субклонировали по сайтам рестрикции *SalGI*-*SstI*, *Sau3A*-*XbaI*, *AccI*-*AccI*, *AccI*-*HindIII*. В результате в составе плазмиды *pUC19* получены субфрагменты, содержащие участок гена белка *VP4b* (*SalGI*-*SstI*, плазмида *pU4b*), большую часть гена 9К с концевым участком гена белка *VP4b* (*Sau3A*-*XbaI*, плазмида *pU9K*), ген 26К без первых 27 п. п. и с первыми 87 п. п. гена 17К (*AccI*-*AccI*, плазмида *pU26K*), ген 17К без первых 87 п. п. (*AccI*-*HindIII*, плазмида *pU17K*) (рис. 2). Все субфрагменты, а также ряд других фрагментов ДНК ВОВ проверили на способность гибридизоваться с [^{32}P] меченой кДНК, синтезированной на индивидуальной мРНК, выделенной с помощью антисыворотки АС35(ВЭМ). В качестве положительного контроля при этом использовали [^{32}P] меченую кДНК, синтезированную на мРНК из суммарных полисом инфицированных

клеток, не связавшихся с АС35 (ВЭМ) в процессе выделения специфической мРНК. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что полученная специфическая кДНК гибридизуется только с фрагментом, содержащим ген 26К, и в меньшей степени — с *HindIII* К-фрагментом ДНК ВОВ. Отсутствие взаимодействия индивидуальной кДНК с суммарной вирусной ДНК, по-видимому, объясняется очень низкой долей в ней одного гена (ген 26К составляет 1/250 часть длины генома). Для того чтобы объяснить эти результаты, необходимо учесть также то, что проведенный ранее транскрипционный анализ *HindIII* К-фрагмента

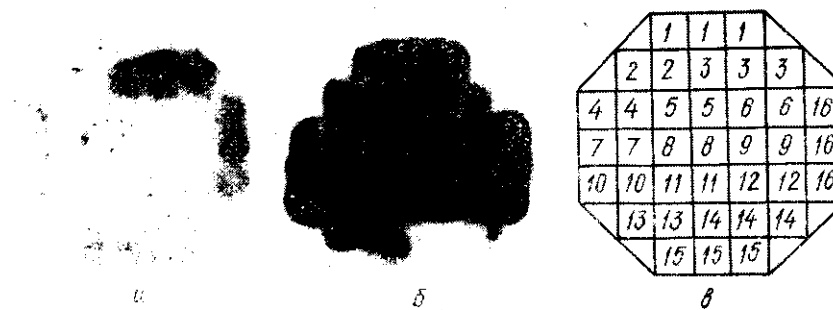


Рис. 3. Гибридизация специфической (а) и суммарной (б) [³²P] меченых кДНК с фрагментами ДНК ВОВ (штамм А-ПВП), клонированными в плазмидах *pBR322* и *pUC19*; в - схема вписания фрагментов: 1 - ДНК ВОВ (0,05 мкг); 2 - правый *HindIII*-*A-SalGI*-фрагмент (0,1 мкг); 3 - плазмида *pU26K* (0,1 мкг); 4 - плазмида *pU9K* (0,1 мкг); 5 - плазмида *pU17K* (0,1 мкг); 6 - плазмида *pU4b* (0,1 мкг); 7-11 - внутренние *BamHI*-субфрагменты *HindIII*-*A*-фрагмента (по 0,1 мкг); 12 - *HindIII*-*I*-фрагмент (0,1 мкг); 13 - *HindIII*-*L*-фрагмент (0,1 мкг); 14 - плазмида *pBR322* (0,1 мкг); 15 - плазмида *pUC19* (0,1 мкг); 16 - *HindIII*-*K*-фрагмент

Fig. 3. Hybridization of specific (A) and total (B) [³²P]-labeled cDNAs to vaccinia DNA fragments cloned in *pBR322* and *pUC19* plasmids. C. - the scheme of the DNA patterns arrangement. 1. - vaccinia DNA (0.05 μg); 2. - right *HindIII* A-*SalGI* fragment; 3. - *pU26K* (0.1 μg); 4. - *pU9K* (0.1 μg); 5. - *pU17K* (0.1 μg); 6. - *pU4b* (0.1 μg); 7-11. - internal *BamHI* subfragments of the *HindIII* A-fragment (0.1 μg); 12. - *HindIII* I fragment (0.1 μg); 13. - *HindIII* L fragment (0.1 μg); 14. - *pBR322* (0.1); 15. - *pUC19* (0.1 μg); 16. - *HindIII* K fragment (0.1 μg).

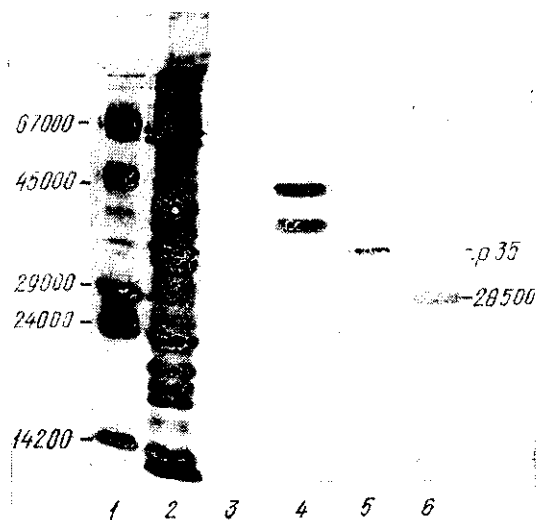
(*HindIII* J-фрагмент по карте ДНК штамма WR) не выявил в нем каких-либо генов, способных кодировать полипептид с м. м. ~ 27 000 [17]. Видимо, взаимодействие полученного зонда с этим фрагментом связано со случайным частичным совпадением первичных структур ДНК, в то время как геном белка *p35* является ген 26К, расположенный на левом плече *HindIII* А-фрагмента вирусной ДНК. Для окончательного подтверждения данного факта в настоящее время проводится клонирование гена 26К в экспрессирующем бактериальном векторе (плазмиде *pUR290*) с целью иммунохимического анализа его белкового продукта. Интересным представляется вопрос о том, каким образом полипептид с м. м. 26 200 превращается в белок *p35*. Увеличение молекулярной массы могло бы быть связано с его гликозилированием, поскольку известно, что белок *p35* является гликопротеином [18]. В структуре полипептида, кодируемого геном с м. м. 26 000, обнаружены четыре потенциальных сайта N-гликозилирования [16]. Известно, что в составе полисахаридных цепей гликопротеинов очень часто встречаются остатки N-ацетилглюкозамина, связанные 1,4-β-гликозидными связями. Одним из примеров такого гликопротеина является овальбумин куриного яйца [19]. Гидролиз 1,4-β-гликозидных связей между остатками N-ацетилглюкозамина катализирует фермент хитиназа (поли[1,4-β-(2-ацетамид-2-дезоксид-D-глюкозид)]гликаногидролаза). Мы обработали этим ферментом белок *p35*, выделенный электрофоретически, для частичного его дегликозилирования. На рис. 4 видно, что такая обработка приводит к уменьшению кажущейся м. м. белка *p35* до 28 500.

Аналогичное изменение происходит и с овальбумином. Полученные данные подтверждают тот факт, что предшественником белка *p35* оболочки вируса ВОВ является полипептид с м. м. 27 000 [12] и что его геном может являться ген *26K*, находящийся на левом плече *HindIII* А-фрагмента ДНК ВОВ.

В то время как данная работа была практически завершена, в литературе появилась статья, авторы которой картировали ген белка *p35* оболочки ВОВ штамма ИHD в *HindIII* Н-фрагменте геномной ДНК (*HindIII* I-фрагмент по карте ДНК штамма Л-ИВП) [20]. Однако

Рис. 4. Электрофореграмма белковых препаратов: 1 — маркеры молекулярной массы (45 000, овальбумин); 2 — суммарные белки вируса ВОВ; 3 — 0,2 мкг препарата хитиназы; 4 — овальбумин, обработанный хитиназой; 5 — электрофоретически выделенный белок *p35* оболочки ВОВ; 6 — белок *p35*, обработанный хитиназой

Fig. 4. Electrophoresis of protein patterns. 1.— molecular weight markers (45kD-ovalbumin); 2.— vaccinia virus total proteins; 3.— 0.2 µg of hytinase; 4.— hytinase treated ovalbumin; 5.— electrophoretically purified vaccinia envelope protein *p35*; 6.— hytinase treated protein *p35*.



представленные авторами результаты не являются бесспорными. Во-первых, для идентификации соответствующего продукта бесклеточной трансляции они использовали антисыворотку к оболочке ВОВ штамма ИHD, в состав которой входит не только белок *p35*. Во-вторых, авторами не показано, что выявленный ими с помощью этой антисыворотки продукт бесклеточной трансляции точно совпадает по электрофоретической подвижности с вирусным белком *p35*. Это совершенно необходимо было сделать в случае немоноспецифической сыворотки. Кроме того, в более ранней работе других авторов [21] продемонстрировано, что тому же участку *HindIII* Н-фрагмента вирусной ДНК соответствует продукт бесклеточной трансляции, имеющий аномальную электрофоретическую подвижность на уровне белка с м. м. 40 000, а не 35 000.

В связи с этим опубликованные упомянутыми авторами данные [20], по-видимому, нуждаются в дополнительном и более глубоком экспериментальном анализе с учетом полученных нами результатов.

Таким образом, в данной работе проведено иммунохимическое выделение мРНК с помощью антисыворотки к NP40-фракции ВЭМ. Показано, что кДНК, синтезированная на этой мРНК, специфически гибридизуется с геном, находящимся на левом плече *HindIII* А-фрагмента вирусной ДНК.

Этот ген кодирует полипептид с расчетной м. м. 26 200, который, по-видимому, является предшественником гликопротеина оболочки вируса ВОВ *p35*.

Авторы выражают признательность за ценные методические рекомендации И. А. Рязанкину и П. А. Белавину, а также О. И. Рязанкиной — за предоставление клонированных *HindIII* I, K и L-фрагментов ДНК ВОВ.

ISOLATION OF SPECIFIC mRNA USING ANTISERUM AGAINST THE P³⁵ PROTEIN OF VACCINIA VIRUS ENVELOPE AND MAPPING OF THE P³⁵ PROTEIN GENE

A. I. Muravlev, N. A. Chikaev, N. A. Netesova, N. V. Cheshenko,
A. B. Beklemishev, N. P. Mervetsov

All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Koltsovo, Novosibirsk region

Summary

An immunochemical isolation of a specific mRNA from vaccinia virus infected cells has been carried out using antiserum against the p³⁵ protein of the virion envelope. The cDNA synthesized on this mRNA has been shown to hybridize specifically to the gene started at the distance of ~1150 base-pairs of the left end of the vaccinia virus DNA HindIII A fragment. This gene encode a 26.200-M_r polypeptide. Treatment of the p³⁵ protein with bilirubin results in a decrease of its molecular weight to 28.5 kD. The gene mapped is supposed to encode the precursor of the vaccinia virus envelope glycoprotein p³⁵.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mackett M., Smith G. L. Vaccinia virus expression vectors // J. Gen. Virol.—1986.— 67, N 10.— P. 2067—2082.
2. Wittek R., Hanggi M., Hiller G. Mapping of a gene coding for a major late structural polypeptide on the vaccinia virus genome // J. Virol.—1984.— 49, N 2.— P. 371—378.
3. Wittek R., Richner B., Hiller G. Mapping of the genes coding for the two major vaccinia virus core polypeptides // Nucl. Acids Res.—1984.— 12, N 12.— P. 4835—4848.
4. Rosel J., Moss B. Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b // J. Virol.—1985.— 56, N 3.— P. 830—838.
5. Hirt P., Hiller G., Wittek R. Localization and fine structure of a vaccinia virus gene encoding an envelope antigen // Ibid.—1986.— 53, N 3.— P. 757—764.
6. Weir J. P., Moss B. Use of a bacterial expression vector to identify the gene encoding a major core protein of vaccinia virus // Ibid.—1985.— 56, N 2.— P. 534—540.
7. Niles E. G., Seto J. Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein // Ibid.—1988.— 62, N 10.— P. 3772—3778.
8. Maa J.-S., Esteban M. Structural and functional studies of a 39,000-M_r immunodominant protein of vaccinia virus // Ibid.—1987.— 61, N 12.— P. 3910—3919.
9. Rodriguez J. F., Esteban M. Mapping and nucleotide sequence of the vaccinia virus gene that encodes a 14-kilodalton fusion protein // Ibid.— N 11.— P. 3550—3554.
10. Rodriguez J. F., Kahn J. S. Molecular cloning, encoding sequence and expression of vaccinia virus nucleic acid-dependent nucleoside triphosphatase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.— 83, N 24.— P. 9566—9570.
11. Муравлев А. И., Порываева В. А., Решетников С. С. Изучение антигенных свойств белка p³⁵ вируса осповакцины в составе различных белковых фракций вириона с помощью моноспецифических антисывороток // Молекуляр. генетика.— 1989.— № 9.— С. 3—7.
12. Анализ структурных белков и продуктов бесклеточной трансляции мРНК вируса осповакцины с помощью моноспецифических антисывороток / А. И. Муравлев, Н. А. Нетесова, В. Я. Тихонов, Э. Г. Малыгин // Там же.— № 10.— С. 19—24.
13. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
14. Cabrera C. V., Esteban M. Procedure for purification of intact DNA from vaccinia virus // J. Virol.—1978.— 25, N 1.— P. 442—445.
15. Иммунохимический анализ продуктов трансляции мРНК, гибридуемой с левым HindIII A-Sal-фрагментом ДНК вируса осповакцины / Н. А. Нетесова, А. И. Муравлев, Н. В. Чешенко и др. // Молекуляр. генетика.— 1989.— № 11.— С. 21—23.
16. Weinrich S., Hruby D. E. A tandemly-oriented late gene cluster within the vaccinia virus genome // Nucl. Acids Res.—1986.— 14, N 7.— P. 3003—3016.
17. Bajszar G., Wittek R., Moss B. Vaccinia virus thymidine kinase and neighboring genes: mRNAs and polypeptides of wild type virus and putative nonsense mutants // J. Virol.—1983.— 45, N 1.— P. 62—72.
18. Boisvert J., Yamamoto T. Purification and location of the major glycoprotein of vaccinia virus // Microbios.—1976.— 16, N 43.— P. 55—72.
19. Lee Y. C., Scola J. R. A common structural unit in asparagine-oligosaccharides of several glycoproteins from different sources // J. Biol. Chem.—1972.— 247, N 18.— P. 5753—5758.
20. Gordon J., Kovala T., Dales S. Molecular characterization of a prominent antigen of the vaccinia virus envelope // Virology.—1988.— 167, N 2.— P. 361—369.

21. *Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment* / J. L. Roscl, P. L. Earl, J. P. Weir, B. Moss // *J. Virol.*— 1986.— 60, N 2.— P. 436—449.

ВНИИ молекуляр. биологии НПО «Вектор»
Минмедпрома СССР, пос. Кольцово Новосиб. обл.
Ин-т молекуляр. биологии и биохимии АН КазССР,
Алма-Ата
Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск

Получено 11.03.90

УДК 577.391

А. И. Медведев, Г. И. Ревина

КИСЛЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ КАК ИНГИБИТОРЫ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

Показана способность полипептидов, состоящих из аспарагиновой и глутаминовой кислот, ингибировать репарацию двунитевых разрывов ДНК, вызванных γ -облучением клеток HeLa и китайского хомячка. Полное ингибирование репарации наблюдалось при концентрациях 20 (полиглутамат, молекулярная масса 2 000—12 000) и 100 мкмоль/л (аспартилглутамат, 1 500—4 500). Оба полипептида в указанных концентрациях малотоксичны, действие ингибиторов обратимо.

Введение. Ингибиторы репарации разрывов ДНК применяются в радиобиологии, цитологии, прикладной онкологии для выяснения механизма определения эффективности действия физических и химических факторов, оказывающих летальное и мутагенное действие на клетки, а также для усиления действия ионизирующего облучения при радиотерапии опухолей. Описано использование ингибиторов разной химической природы, вызывающих полное подавление восстановления двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках эукариот, индуцированных воздействием облучения. Такой эффект вызывают ЭДТА в концентрации 5 000—10 000 мкмоль/л и специфический ингибитор ДНК-полимераз 9-арабинофуранозилацидин (400 мкмоль/л) [1, 2].

В настоящей работе описываются свойства нового класса ингибиторов, отличающегося по химической природе от известных,— кислых α -полипептидов, также вызывающих полное ингибирование восстановления индуцированных γ -облучением ДР ДНК в клетках млекопитающих в существенно меньших концентрациях и обладающих меньшей токсичностью [3].

Материалы и методы. В работе исследовали два синтетических аналога природного модификатора [4] радиационного мутагенеза — аспартилглутамат (АГ) со среднечисленной молекулярной массой (м. м.) 2 365 и полиглутамат (ПГ) со среднечисленной м. м. 3 953. Полипептид АГ (м. м. 1 500—3 500) получали согласно ранее описанной методике [4], м. м. коммерческого («Fergak», Западный Берлин) препарата ПГ составляла 2 000—15 000.

В экспериментах использовали монослойную культуру двухдневных клеток китайского хомячка клонов 237, 431 и клеток HeLa, которые культивировали на среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Сразу после посева клеток в среду вводили [³H]тимидин (18,5 кБк/мл) на сутки. За 16 ч до начала эксперимента среду с меченым тимидином сливали, клетки промывали средой Эрла и инкубировали в среде с сывороткой.

Исследование ингибирования протекающей репарации ДР ДНК проводили согласно методике [5]. Клетки отмывали физиологическим раствором и инкубировали в растворах полипептидов с указанными далее концентрациями, облучали при мощности дозы 3,6 Гр/мин (Co⁶⁰) при температуре 37 или 4 °С. После прекращения облучения, обработки полипептидом или одновременной обработки полипептидами и облучения

© А. И. МЕДВЕДЕВ, Г. И. РЕВИНА, 1990