



УДК 578.841:577.113:578.23

## ОБНАРУЖЕНИЕ КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОГО С ДНК КЛЕТКИ ГЕНОМА БАКУЛОВИРУСА У БОЛЬШОЙ ВОЩИНОЙ МОЛИ ПРАЖСКОЙ ЛИНИИ

Н. Ю. Мирюта, Л. И. Строковская, И. П. Кок, И. Н. Скуратовская

Вирусносительство широко распространено у чешуекрылых насекомых и имеет большое практическое значение. Латентный вирус ядерного полиэдрома (ВЯП) легко активизируется у насекомых некоторых видов и их изолятов под влиянием различных, не всегда изученных факторов, что ведет к развитию продуктивной инфекции и указывает на полиценность вирусного генома. В клетках одного из таких насекомых — тутового шелкопряда — методами молекулярной биологии впервые показана интеграция генома вируса и клетки [1]. Но существуют изоляты насекомых, у которых не наблюдается спонтанный ядерный полиэдроз; можно предположить, что у них нет латентного вируса. К ним относится, например, большая вошная моль (БВМ) пражской линии. Однако при заражении таких насекомых чужеродным ВЯП через несколько пассажей появляются вирусные тела включения — полиэдры, по кубической форме характерные для ВЯП БВМ [2]. Одной из причин этого явления может быть присутствие в геноме клетки нуклеотидных последовательностей ВЯП БВМ. Для проверки такой возможности мы применили молекулярно-биологические методы, разработанные в 70-х годах для изучения состояния генома вируса в клетках позвоночных [3, 4].

В работе использовали личинок БВМ пражской линии, штамм М-1 ВЯП БВМ, описанный ранее [1], и ВЯП кольчатого шелкопряда (КШ), паработанный на культуре клеток.

Суперспиральную вирусную ДНК получали центрифугированием лизата вируса в градиенте плотности хлорного цезия с этидия бромидом [5].  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП с удельной активностью  $10^7$ — $10^8$  нмп/млн/мкг получали методом ник-трансляции [6]. Высокомолекулярную клеточную ДНК выделяли из ядер клеток здоровых личинок БВМ и из молочной железы коровы (МЖК) фенольно-детергентным методом. ДНК тимуса теленка — коммерческая, отечественного производства. Дробление и денатурацию, кинетику реассоциации и определение числа копий вирусных геномов (величину этих геномов можно округлить до  $10^8$ ), приходящихся на клеточный геном, проводили, как в работе [3]. Сеть ДНК, образующуюся при денатурации повторяющихся последовательностей клеточной ДНК, с которыми ковалентно связаны вирусные нуклеотидные последовательности, получали по Вармусу [4]. Полученные фракции исследовали на содержание вирусных нуклеотидных последовательностей методом кинетики реассоциации.

Анализ кривых кинетики реассоциации  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ в присутствии испытываемой клеточной ДНК БВМ выявил отклонения этих кривых от кинетики второго порядка. Результаты опытов, проведенных с целью выявления причин этих отклонений и определения оптимальных соотношений вирусной и клеточной ДНК, показали, что наименьшие отклонения соответствуют соотношениям концентраций немеченой вирусной (присутствующей в препаратах клеточной ДНК) к меченой вирусной ДНК, лежащим в области  $2 \div 10$ . Обнаруживаемые при этом доли вирусного генома в клеточной ДНК составляют  $0,5 \div 0,8$ . Подобранные соотношения позволили получить наименьшие значения поправки для определения числа копий вирусной ДНК, приходящейся на геном клетки хозяина.

Приведенные в качестве примера на рис. 1 результаты говорят об ускорении реассоциации  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ в присутствии клеточной ДНК БВМ, которое свидетельствует о наличии вирусных нуклеотидных последовательностей в препаратах клеточной ДНК. Это позволяет определить число копий вирусной ДНК, приходящейся на геном БВМ пражской линии, которое в данном случае равно трем. Подсчет среднего значения числа геномов вируса на клетку методом, применяемым для обработки косвенных измерений, показал, что на диплоидный геном БВМ (размер генома у чешуекрылых насекомых составляет примерно  $6 \cdot 10^{11}$ ) приходится  $2,0 \pm 0,6$  вирусных геномов, причем полученные значения принадлежат к данной совокупности с надежностью  $\alpha = 0,9$ .

О наличии ковалентной связи вирусной и клеточной ДНК судят по распределению вирусной ДНК во фракциях сети и надосадка [4], принимая во внимание вели-

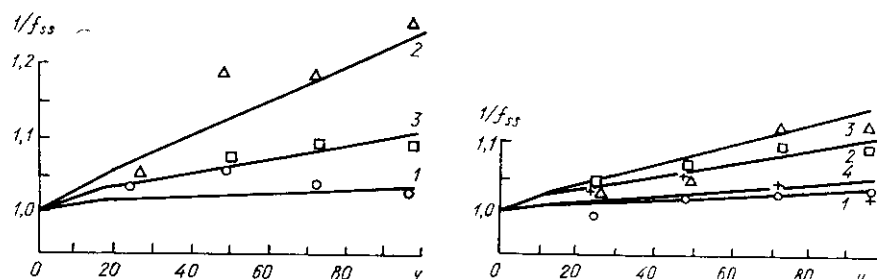


Рис. 1. Выявление вирусной ДНК в препаратах клеточной ДНК БВМ: 1 — кинетика реассоциации  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ (0,02 мкг/мл) в присутствии тимусной ДНК (180 мкг/мл); 2 — тимусной ДНК в таком же количестве + ДНК ВЯП БВМ (0,25 мкг/мл); 3 — клеточной ДНК БВМ пражской линии (180 мкг/мл);  $f_{ss}$  — фракция  $^{32}\text{P}$ -ДНК, которая остается односпиральной при  $t$  (времени отжига).

Fig. 1. Revealing of viral DNA in cell DNA of *Galleria mellonella*: kinetics of reassociation of  $^{32}\text{P}$ -labelled NPV DNA (0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in presence of thymus DNA (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (1); thymus DNA (the same concentration) and NPV of *G. mellonella* DNA (0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (2); cell *G. mellonella* DNA (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (3);  $f_{ss}$  — the fraction of  $^{32}\text{P}$ -labelled DNA that is single-stranded at  $t$  (time of annealing).

Рис. 2. Анализ содержания вирусных нуклеотидных последовательностей во фракциях сети и надосадка клеточной ДНК БВМ пражской линии: 1 — кинетика реассоциации  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ (0,02 мкг/мл) в присутствии тимусной ДНК (180 мкг/мл); 2 — препарата ДНК БВМ (180 мкг/мл); 3 — фракции сети этой ДНК (147 мкг/мл); 4 — фракция надосадка этой ДНК (61 мкг/мл).

Fig. 2. Analysis of viral nucleotide sequence content in network and supernatant fractions of Prague stock *G. mellonella* DNA: kinetics of reassociation of  $^{32}\text{P}$ -labelled NPV DNA (0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in presence of thymus DNA (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (1); cell *G. mellonella* DNA (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (2); network fraction of cell *G. mellonella* DNA (147  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (3); supernatant fraction of cell *G. mellonella* DNA (61  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (4).

чину неспецифического связывания [7]. Определяя эту величину, получали сеть недробленной клеточной ДНК БВМ с добавлением 5 копий ДНК ВЯП КШ на геном клетки насекомого и сеть ДНК МЖК с добавлением 20 копий ДНК ВЯП БВМ на геном клетки млекопитающих. Сравнение количеств вирусной ДНК во фракциях сети и надосадка, определяемых методом кинетики реассоциации при величине сетсообразования 84—87 %, показало, что неспецифическое связывание ДНК вируса сетью составляет 23—24 %. Это значение близко к неспецифическому связыванию ДНК вируса герпеса [7], размер генома которого близок к величине бакуловиральной ДНК. Приведенные на рис. 2 результаты одного из опытов по анализу на содержание вирусных нуклеотидных последовательностей во фракциях сети и надосадка ДНК БВМ пражской линии методом кинетики реассоциации показали наличие вирусных нуклеотидных последовательностей в обеих фракциях; расчет, произведенный по этим данным, показал, что при величине сетсообразования 86—87 % во фракции сети обнаружено 60 % (а в среднем по трем опытам  $50 \pm 10$  %) вирусной ДНК. Это значение выше величины неспецифического связывания и говорит о наличии ковалентной связи вирусной ДНК и ДНК БВМ пражской линии.

Резюмируя результаты проведенных опытов, можно сделать следующие выводы. В здоровых личинках БВМ пражской линии присутствует вирусная ДНК в количестве  $2,0 \pm 0,6$  генома ВЯП на диплоидный геном клетки. Большая часть присутствующих

в клетках вирусных нуклеотидных последовательностей обнаруживается в ковалентно связанном состоянии. В дальнейших исследованиях мы хотим выяснить локализацию вирусных нуклеотидных последовательностей в геноме клеток, а также решить вопрос о том, непрерывна ли последовательность вирусной ДНК или ее отдельные участки включены в клеточный геном разобщенно.

#### FINDING OF BACULOVIRUS GENOME COVALENT-BOUND WITH THE CELL DNA IN PRAGUE STOCK *GALLERIA MELLONELLA*

*N. Yu. Miryuta, L. I. Strokovskaya, I. P. Kok, I. N. Skuratovskaya*

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

#### Summary

NPV nucleotide sequences were revealed in the cell DNA of Prague stock *Galleria mellonella*. The viral genome copy number per host cell was quantified by kinetic reassociation method. Using the network technique and kinetic reassociation in presence of labeled DNA it was shown that the viral DNA was covalently bound with the Prague stock genome.

1. *Обнаружение интеграции бакуловирусного и клеточного геномов (ДНК) при латентной инфекции* / И. П. Кок, И. Н. Скуратовская, Л. И. Строковская и др.— Молекуляр. биология, 1983, вып. 34, с. 67—69.
2. *Примаченко Л. В.* Про адаптацію вірусу ядерного поліедрозу шовковичного шовкопряду до великої вошиної молі.— Мікробіол. журн., 1970, 32, № 4, с. 487—490.
3. *Gelb L. D., Kohne D. E., Martin M. A.* Quantitation of simian virus 40 sequences in African green monkey, mouse and virus transformed cell genomes.— J. Mol. Biol., 1971, 57, N 1, p. 129—145.
4. *Varmus H., Vogt P. K., Bishop J. M.* Integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection for permissive and nonpermissive hosts.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, N 11, p. 3067—3071.
5. *Supercoiled DNA of nuclear polyhedrosis virus of Galleria mellonella L.* / I. N. Skuratovskaya, L. I. Strokovskaya, E. N. Zhrebtsova, A. P. Gudz—Gorban.— Arch. Virol., 1977, 53, N 1, p. 79—86.
6. *Labelling DNA to high specific in vitro by nick translation with DNA polymerase I.* / P. W. J. Rigby, M. Dickman, C. Rhode, P. Berg.— J. Mol. Biol., 1977, 113, N 1, p. 237—251.
7. *Padgett R. A., Moore D. E., Kingsbury D. T.* Herpes virus nucleic acid synthesis following infection of nonpermissive XC cells.— J. Gen. Virol., 1978, 40, N 3, p. 605—614.

Ин-т молекулярной биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 28.08.84