



УДК 578.841.1:577.113

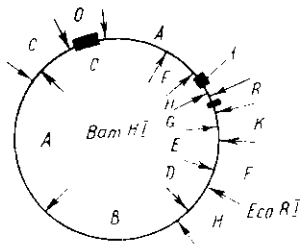
## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОМА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ НА ФИЗИЧЕСКОЙ КАРТЕ ГЕНОМА

В. А. Мордвинов, И. Х. Урманов, Н. Г. Холодилов, И. В. Никонов

При исследовании структуры генома бакуловирусов нами был изучен характер гидролиза ДНК вируса ядерного полиэдроза большой вощинной моли эндонуклеазами рестрикции, проведено клонирование в клетках *Escherichia coli* *EcoRI*- и *BamHI*-фрагментов этой ДНК в составе плазмид *pSF124* и *pBR322* [1]. При трансформации клеток насекомых *SCLd-135* гибридными плазмидами, несущими индивидуальные фрагменты вирусной ДНК: *EcoRI-O* размером  $1,39 \cdot 10^6$  и *BamHI-H* размером  $0,60 \cdot 10^6$ , было показано, что эти фрагменты (из многих других испытанных) содержат нуклеотидные последовательности, способные выполнять роль *ori*-района генома вируса [2].

Проведено клонирование *EcoRI*-фрагментов вирусной ДНК в клетках *E. coli* в составе вектора *pSK*, имеющего делецию в области промотора гена устойчивости к тетрациклину [3]. Это позволило выявить, что *EcoRI-R*-фрагмент вирусной ДНК может выполнять роль промотора в прокариотической системе (клетки, трансформированные гибридной плазмидой с *R*-фрагментом, растут на среде, содержащей тетрациклин).

Для локализации на физической карте генома вирусного генома функционально активных областей мы воспользовались данными работы [4], в которой показано, что *BamHI*-



Локализация функционально активных областей (1) на физической карте генома вируса ядерного полиэдроза большой вощинной моли. Стрелками указаны сайты рестрикции ДНК эндонуклеазами *BamHI* (внутри) и *EcoRI* (снаружи).

Localization of functionally active regions (1) on the physical map of nuclear polyhedrosis virus genome *Galleria mellonella*. The arrows show site of DNA restriction by *BamHI* (inside) and *EcoRI* (outside) endonucleases.

фрагменты вирусной ДНК следуют друг за другом в следующем порядке (геном представлен в линейной форме): А (размером  $26,1 \cdot 10^6$ ) — С ( $17,09 \cdot 10^6$ ) — F ( $2,4 \cdot 10^6$ ) — Н ( $0,6 \cdot 10^6$ ) — G ( $2,03 \cdot 10^6$ ) — E ( $4,14 \cdot 10^6$ ) — D ( $6,5 \cdot 10^6$ ) — В ( $21,81 \cdot 10^6$ ). Для локализации активных фрагментов *EcoRI-O* и *EcoRI-R* провели дополнительное картирование. Вирусную ДНК гидролизовали одновременно двумя рестриктазами *BamHI* и *EcoRI*. Препаративно выделили индивидуальные *BamHI*-фрагменты генома и гидролизовали каждый из них ферментом *EcoRI*. Сопоставление картин электрофоретического разделения в агарозном геле продуктов этих различных гидролизом и определение размеров фрагментов позволило картировать изучаемые фрагменты на *BamHI*-карте генома (рисунок).

Оказалось, что фрагмент *EcoRI-O* ( $1,39 \cdot 10^6$ ) расположен в *BamHI*-фрагменте С; фрагмент *EcoRI-R* ( $0,85 \cdot 10^6$ ) — в *BamHI*-фрагменте G. *EcoRI*-фрагменты O и R разделены фрагментом *EcoRI-A* ( $10,67 \cdot 10^6$ ). Следовательно, фрагменты *BamHI-H* и *EcoRI-O*, содержащие «области *ori*», разделены довольно большим участком генома ( $\sim 10 \cdot 10^6$ ). На *EcoRI*-карте активные фрагменты соседствуют (кроме А) еще с такими фрагментами: O с С ( $8,17 \cdot 10^6$ ), а R с К ( $2,32 \cdot 10^6$ ).

LOCALIZATION OF FUNCTIONALLY IMPORTANT GENOME  
REGIONS OF THE *GALLERIA MELLONELLA* L. NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS  
ON THE PHYSICAL MAP OF THE VIPAL GENOME

V. A. Mordvinov, I. Kh. Urmanov, N. G. Kholodilov, I. V. Nikonov

Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk

Summary

Three regions are localized on the physical DNA map using *Bam*HI and *Eco*RI restriction endonucleases. Two regions have *ori* function and the third one possesses a promoter function in the procaryotic system.

1. Анализ ДНК вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли с помощью эндонуклеаз рестрикции и ее клонирование в клетках *E. coli* / В. А. Мордвинов, И. Х. Урманов, Н. Г. Холодилов, А. А. Ильичев.—Молекуляр. биология, 1983, вып. 34, с. 70—73.
2. Nucleotide sequence of the *Galleria mellonella* NPV origin of DNA replication / V. M. Blinov, V. V. Gutorov, N. G. Holodilov et al.—FEBS Lett., 1984, 167, N 2, p. 254—258.
3. Конструирование и свойства вектора для клонирования промоторсодержащих фрагментов ДНК. Клонирование промоторов *E. coli* и бактериофага T7 / О. И. Серпинский, Е. А. Каргинова, Н. Н. Микрюков и др.—Биоорганич. химия, 1982, 8, № 6, с. 840—847.
4. Урманов И. Х., Кравченко В. В. Характеризация генома вируса ядерного полиэдроза *Galleria mellonella* с помощью эндонуклеаз рестрикции. Картирование мест расщепления *Bam*HI на кольцевой ДНК вируса.— В кн.: Структура и функции плазмид: Тез. докл. V. Всесоюз. совещ. по прогр. «Плазмида». М., 1980, с. 215.

ВНИИ молекуляр. биологии  
Главмикробиопроба при СМ СССР,  
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Получено 22.01.85

УДК 577.152.611

МОДИФИКАЦИЯ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ *E. COLI*  
С ПОМОЩЬЮ 1,N<sup>6</sup>-ЭТЕНОАДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТА

В. Н. Подуст, Г. А. Невинский, О. И. Лаврик

**Введение.** 1,N<sup>6</sup>-Этеноаденозин-5'-трифосфат ( $\Sigma$ АТР)\* широко используется для изучения различных нуклеотидзависимых ферментов [1], в том числе и для исследования АТР-узнающих участков аминоксил-тРНК-синтетаз [2, 3] как в качестве флюоресцирующего аналога субстрата, так и флюоресцентной метки.  $\Sigma$ АТР является субстратом в реакции аминокислотирования тРНК, катализируемой фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* [2].

В литературе отсутствуют данные о зависимых от УФ-света превращениях этенированных нуклеотидов. В то же время  $\Sigma$ АТР по сравнению с АТР хорошо поглощает свет в области 300—350 нм. Это обстоятельство позволило нам надеяться на возбуждение молекулы этенонуклеотида монохроматическим светом азотного лазера с длиной волны 337 нм с последующим ковалентным присоединением аналога нуклеотида к белку. Возможность подобного введения метки в белок представляется особенно перспективной ввиду того, что белки практически не поглощают свет с длиной волны выше 300 нм.

В связи с этим в работе исследована возможность прямого фотоприсоединения  $\Sigma$ АТР к фенилаланил-тРНК-синтетазе *E. coli* под действием монохроматического света азотного лазера.

**Материалы и методы.** Фенилаланил-тРНК-синтетаза из *E. coli* MRE-600 была выделена, согласно [4]. тРНК из *E. coli* MRE-600 была получена, согласно [5]. АТР, L-фенилаланин фирмы «Reanal», Венгрия. L-[<sup>14</sup>C]-фенилаланин (360 Ки/моль) —

\* Здесь и далее вместо  $\Sigma$ АТР следует читать  $\epsilon$ АТР.