

1. *Celis J. E.* Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques // *Biochem J.*— 1984.— 223, N 2.— P. 281—291.
2. *Anderson W. F.* Prospects for human gene therapy // *Science.*— 1984.— 226, N 4673.— P. 401—409.
3. *Cepko C. L., Roberts B. E., Milligan R. C.* Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector // *Cell.*— 1984.— 37, N 3.— P. 1053—1062.
4. *Fusogenic* reconstituted Sendai virus envelopes as a vehicle for introducing DNA into viable mammalian cells / A. Vainstein, A. Razin, A. Grassmann, A. Loyter // *Meth. Enzymol.*— 1983.— 101.— P. 493—512.
5. *Hsu M.-Ch., Scheid A., Choppin R. W.* Reconstitution of membranes with individual paramyxovirus glycoproteins and phospholipid in cholera solution // *Virology.*— 1979.— 95, N 2.— P. 476—491.
6. *Reconstitution* and fusogenic properties of Sendai virus envelopes / M. C. Harmsen, J. Wilschut, G. Scherphof et al. // *Eur. J. Biochem.*— 1985.— 149, N 3.— P. 591—599.
7. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
8. *Protein* measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.*— 1951.— 193, N 1.— P. 265—275.
9. *Citovsky V., Blumenthal R., Loyter A.* Fusion of Sendai virions with phosphatidylcholine-cholesterol liposomes reflects the viral activity required for fusion with biological membranes // *FEBS Lett.*— 1985.— 193, N 2.— P. 135—140.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск  
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 25.02.87

УДК 578.822.1:577.113

## НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК ВИРУСА ДЕНСОНУКЛЕОЗА КОМАРОВ

Л. П. Буцацкий, О. М. Филенко

Мелкий сферический вирус кровососущих комаров — вирус денсонуклеоза (ВДК) поражает комаров родов *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, представляя тем самым значительный интерес в плане разработки биологических методов регулирования численности переносчиков [1].

В предыдущей нашей работе [2] показано, что вирус денсонуклеоза комаров относится к семейству *Parvoviridae*. Основываясь на физико-химических свойствах ДНК, это семейство разделяют на две группы. У представителей одной из них (род *Parvovirus*) в вирионах содержится линейная однонитевая молекула, а у представителей другой (род *Densovirus* и род *Dependovirus*) в отдельных вирионах содержатся комплементарные («плюс» и «минус») нити ДНК. Из рода денсовирусов наиболее полно охарактеризована ДНК вируса большой вошинной моли [3—7]. В настоящей работе приведены результаты изучения ДНК вируса денсонуклеоза комаров.

**Материалы и методы.** В работе использован штамм ГКВ-002002. Вирус накапливали на личинках лабораторной культуры комаров *Aedes aegypti*, как описано в работе [8]. Очистку ВДК проводили ранее опубликованным способом [2].

ДНК ВДК выделяли по методу, предложенному в работе [9], ее концентрацию определяли спектрофотометрически [10].

Нейтрализованный формальдегид добавляли к суспензии очищенных вирионов и к изолированной ДНК до конечной концентрации 1,8 %. Спектры поглощения снимали сразу же и через 15 ч инкубации при 37 °С на спектрофотометре «Spectrum» (ГДР).

ДНК в 0,1 и 1×SSC инкубировали в интервале температур от 25 до 100 °С в герметически закрытых кварцевых кюветках и спектрофотометрировали при 260 нм на приборе «Spectrum» (ГДР).

Гиперхромизм определяли по формуле:  $H = (OD_T / OD_{20^\circ})^{-1} \cdot 100$  %, где  $OD_T$  и  $OD_{20^\circ}$  — оптическая плотность при 260 нм и температуре T и 20 °С соответственно.

Температуру плавления ( $T_m$ ) определяли как температуру, при которой достигалось 50 % общей величины гиперхромизма.

Центрифугирование ДНК ВДК в градиенте плотности CsCl проводили в аналитической центрифуге «МОМ» 31706 по методу Менделя и др. [11]. Исходная плотность раствора CsCl составляла 1,7 г/см<sup>3</sup>.

Скоростную седиментацию проводили в щелочных условиях в 0,12 М растворе фосфатного буфера (рН 12,0) [12] в аналитической центрифуге «МОМ» 31706 при скорости вращения ротора 40000 об/мин и 20 °С. Концентрация ДНК в пробе составляла от 30 до 60 мкг/мл. Фотографировали в УФ-свете. Фотопластинки денситометрировали с помощью двухлучевого регистрирующего микроденситометра МК ПСКС. Для определения константы седиментации вирусной ДНК ( $S_{20}^{\circ, w}$ ) коэффициенты седиментации приводили к стандартным условиям и графически экстраполировали величину  $1/S_{20}^{\circ, w}$  к бесконечному разведению.

Препараты ДНК для электронной микроскопии готовили по модифицированному методу [13]. Молекулы оттеняли сплавом платины с палладием и просматривали в электронном микроскопе УЭМБ-100 Л.

Очищенную ДНК ВДК хроматографировали на гидроксилapatите согласно [14]. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически — 1,0 оптической плотности при 260 нм для однонитевой ДНК соответствовало ее количество 36 мкг/мл [15].

**Результаты и обсуждение.** Выдерживание очищенных вирусных частиц с формальдегидом приводило к увеличению поглощения при 260 нм и сдвигу максимума поглощения в длинноволновую область (рис. 1). Такое взаимодействие формальдегида с вирионами свидетельствует о том, что ДНК вируса содержит большое количество свободных аминогрупп и находится в форме одной нити. Такие же результаты были получены и с изолированной ДНК вируса.

При плавлении изолированной ДНК ВДК в 0,1×SSC резкого подъема гиперхромизма с увеличением температуры не происходило,

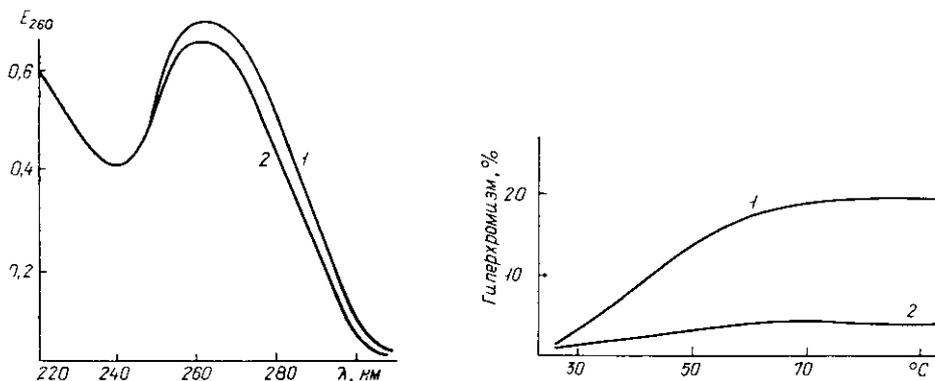


Рис. 1. Влияние формальдегида (1,8 %, рН 7,5) на ДНК ВДК: оптическая плотность до взаимодействия ДНК с формальдегидом (2) и через 15 ч после его добавления (1)  
Fig. 1. The effect of formaldehyde (1.8 %, рН 7.5) on MDV DNA: optical density at zero time (2) and 15 h after the formaldehyde addition (1)

Рис. 2. Кривые плавления ДНК ВДК: в 1×SSC (1) и 0,1×SSC (2)  
Fig. 2. Thermal denaturation of MDV DNA: in 1×SSC (1) and in 0.1×SSC (2)

гиперхромизм не превышал 6 %, что свидетельствует в пользу однонитевой ДНК (рис. 2). При плавлении ДНК в растворе высокой ионной силы (1×SSC) также не наблюдалось резкого подъема гиперхромизма (рис. 2). Однако в этих условиях гиперхромизм по сравнению с таковым при низкой ионной силе увеличивался, достигая 20 %. Температура плавления ДНК ВДК в 1×SSC составила 36 °С. Плавный подъем гиперхромизма в обоих случаях свидетельствует об отсутствии стабильных двуниевых участков в молекуле ДНК. Об этом же свидетельствует и характер элюции ДНК ВДК с гидроксилapatита, а также способность ее служить в качестве матрицы при синтезе комплементарной нити с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (данные не приведены).

При скоростном центрифугировании в щелочной среде ДНК ВДК осаждалась с коэффициентом седиментации 9,2 S. Используя уравнение  $S_{20^{\circ}\text{C}, \omega} = 0,064 M^{0,34}$  [16], для одноцепочечных ДНК установлено, что молекулярная масса изолированной одноцепочечной ДНК ВДК составляет  $2,5 \cdot 10^6$ ; плавучая плотность ДНК ВДК в хлористом цезии —  $1,734 \text{ г/см}^3$ .

При электронно-микроскопическом изучении ДНК ВДК установлено, что все молекулы ДНК являются линейными (рис. 3). Кольцевых



Рис. 3. Электронная микрофотография ДНК ВДК. Ув. 93000  
Fig. 3. Electron micrographs of MDV DNA. Magnification  $\times 93000$

молекул ДНК не выявлено. Средний размер ДНК ВДК составил 2,5 мкм (рис. 4), что соответствует молекулярной массе ДНК  $2,4 \cdot 10^6$  [17].

Как видно из приведенных выше данных, ДНК ВДК является однонитевой как в составе вирусных частиц, так и после ее выделения. Наблюдаемое в опытах увеличение поглощения (260 нм) при взаимодействии вирионов с формальдегидом известно и для других парвовирусов. Так, гиперхромизм парвовируса крыс при взаимодействии с формальдегидом составляет 13—16 % [18], мелкого вируса мышей — 18 % [19]. У ДНК ВДК большой вошпной моли в среде с низкой ионной силой он составляет 12 % [20]. Высокие значения гиперхромизма одноцепочечной ДНК ВДК свидетельствуют о значительном количестве участков со вторичной структурой в интактных вирионах.

В пользу однонитевой природы ДНК ВДК свидетельствует и характер элюции ее с гид-

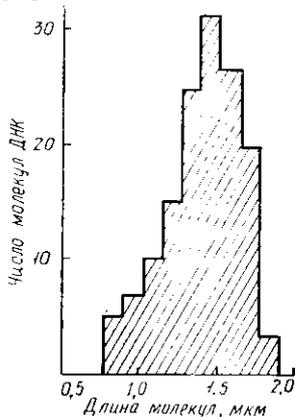


Рис. 4. Гистограмма распределения длины молекул ДНК, изолированной из частиц ВДК  
Fig. 4. Histogram representing the length of DNA molecules isolated from MDV particles

роксилатапата. Как известно, полностью однонитевые ДНК элюируют с гидроксилатапата при концентрации ниже 0,12 М фосфатного буфера, рН 6,8, при 25 °С, в то время как двуспиральные ДНК (по 17 пар оснований) требуют для элюции не менее 0,14 М фосфатного буфера [14]. В наших экспериментах ДНК ВДК элюировалась 0,12 М фосфатным буфером.

Наблюдаемое увеличение гиперхромизма в растворе  $1 \times \text{SSC}$  при плавлении ДНК по сравнению с гиперхромизмом при плавлении ее в растворе  $0,1 \times \text{SSC}$  можно, по-видимому, объяснить наличием палиндромных участков на 3'- и 5'-концах ДНК ВДК (как это показано для других парвовирусов [21]), способствующих образованию в соответствующих условиях двунитевых участков. Об этом может свидетельствовать также и более высокое значение коэффициента седиментации ДНК ВДК в нейтральной среде (17,5 S). Вклад межмолекулярных

взаимодействий при использовании низких концентраций ДНК маловероятен.

При седиментации ДНК в щелочной среде в некоторых препаратах наблюдались и более низкие значения коэффициентов седиментации, свидетельствующие о присутствии в популяции вирионов дефектных вирусных частиц. У парвовирусов такие частицы, содержащие неполные (укороченные) геномы, образуются легко, в особенности при множественной инфекции [22].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ДНК ВДК имеет свойства, сходные с ДНК представителей рода *Parvovirus*, содержащими минус-нити ДНК. Однако в последнее время установлено, что некоторые представители рода *Parvovirus* одновременно содержат как минус-, так и плюс-нити ДНК [23, 24]. В отличие от денсовирусов и денсовирусов ДНК этих вирусов не содержат обращенных концевых повторов. Отсутствие таких повторов является отличительной чертой ДНК рода *Parvovirus*.

Поэтому для окончательного выяснения родовой принадлежности ВДК необходим анализ концевых последовательностей его ДНК.

Авторы выражают благодарность В. И. Приме за помощь в определении температуры плавления ДНК.

#### CERTAIN PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MOSQUITO DENSONUCLEOSIS VIRUS DNA

L. P. Buchatsky, O. M. Filenko

T. G. Shevchenko State University, Kiev

#### Summary

Mosquito densonucleosis virus (MDV) is isolated from the blood-suckling mosquito *Aedes aegypti* and properties of its DNA are characterized. The reaction of formaldehyde with MDV virion and extracted DNA suggests that DNA in situ and in vitro is single-stranded. DNA extracted from MDV has a buoyant density of 1.734 g/cm<sup>3</sup> in cesium chloride. The  $S_{20, w}$  was determined in alkaline sucrose gradients to be 9.2, that corresponds to the molecular weight  $2.5 \times 10^6$  daltons. Basing on the melting curve and the reaction with formaldehyde the DNA of MDV is believed to be closely related to members of the parvovirus subgroup.

1. А. с. 783339 СССР, МКИ<sup>3</sup> С 12 К 1/00. Штамм вируса денсонуклеоза комаров ГКВ-002002 (Mosquito densonucleosis virus GKV-002002) — активный по отношению к кровососущим комарам / Л. П. Бучацкий, Н. Н. Лебединец, М. А. Кузнецова и др. // Бюл. изобретений. — 1980. — № 44. — С. 116.
2. Характеристика вируса денсонуклеоза комаров / Л. П. Бучацкий, Н. Н. Лебединец, О. М. Филенко и др. // Микробиол. журн. — 1985. — 47, № 1. — С. 68—73.
3. Recherches sur l'acide nucleique du lepidoptere *Galleria mellonella* L. / N. Truffaut, G. Berger, A. Niveleau et al. // Arch. gesamt. Virusforsch. — 1967. — 21, N 3. — P. 470—474.
4. Barwise A. H., Walker J. O. Studies on the DNA of a virus from *Galleria mellonella* // FEBS Lett. — 1970. — 6, N 1. — P. 13—16.
5. Kurstak E., Vernoux J. P., Brakier-Gingras L. Etude biophysique de l'acide desoxyribonucleique du virus de la denonucleose (VDN). Extraction du DNA viral et mise en evidence de la presence de chaines polynucleotidiques complementaires, encapsides separement dans les virions VDN // Arch. gesamt. Virusforsch. — 1973. — 40, N 3. — P. 274—284.
6. Kelly D. C., Barwise A. H., Walker J. O. DNA contained by two denonucleosis viruses // J. Virol. — 1977. — 21, N 3. — P. 397—407.
7. Kelly D. C., Bud H. M. Denonucleosis virus DNA: Analysis of fine structure by electron microscopy and agarose gel electrophoresis // J. Gen. Virol. — 1978. — 40, N 1. — P. 33—43.
8. Лебединец Н. Н., Бучацкий Л. П. Влияние условий и длительности хранения вируса денсонуклеоза *Aedes aegypti* на его инфекционные свойства // Микробиол. журн. — 1981. — 43, № 1. — С. 110—113.
9. Marmur J. A procedure for the isolation of DNA from microorganism // J. Mol. Biol. — 1961. — 3, N 1. — P. 208—218.

10. Слюсаренко А. Г. Физико-химические методы анализа состава дезоксирибонуклеиновых кислот // Структура ДНК и положение организмов в системе.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1972.— С. 35—43.
11. Мендель М., Мирмур Д. Определение содержания гуанина и цитозина в ДНК с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl // Методы исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А. Н. Белозерского.— М.: Мир, 1970.— С. 175—183.
12. Bourguignon G. J., Tattersall P. J., Ward D. C. DNA of minute virus of mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex // J. Virol.— 1976.— 20, N 1.— P. 290—306.
13. Delius H., Mantell J., Albers B. Characterization by electron microscopy of the complex formed between T4 bacteriophage gene 32-protein and DNA // J. Mol. Biol.— 1972.— 67, N 3.— P. 341—350.
14. Wilson D. A., Thomas J. Hydroxyapatite chromatography of short double-helical DNA // Biochim. et biophys. acta.— 1973.— 331, N 3.— P. 333—340.
15. Sinsheimer R. L. A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage  $\phi$ X174 // J. Mol. Biol.— 1959.— 1, N 1.— P. 43—53.
16. Eigner J., Doty P. The native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid // Ibid.— 1965.— 12, N 3.— P. 549—580.
17. Freifelder D., Kleinschmidt A. K., Sinsheimer R. L. Electron microscopy of single-stranded DNA: circulatory of DNA of bacteriophage  $\phi$ X174 // Science.— 1964.— 146, N 3274.— P. 254—256.
18. Salzman L. A., Jori L. A. Characterization of the Kilham rat virus // J. Virol. — 1970. — 5, N 2.— P. 114—122.
19. Crawford L. W. A minute virus of mice // Virology.— 1966.— 29, N 4.— P. 605—612.
20. Kelly D. C., Barwise A. H., Walker J. O. DNA contained by two deonucleosis viruses // J. Virol.— 1977.— 21, N 1.— P. 396—407.
21. Berns K. J., Hauswirth W. W. Parvovirus DNA structure and replication // Replication of mammalian parvoviruses. — New York: Cold Spring Harbor Lab., 1978.— P. 13—32.
22. Carter B. J. Variant and defective interfering parvoviruses // The parvoviruses.— New York: Plenum press, 1984.— P. 209—258.
23. Muller D. E., Siegl J. Characterization of parvovirus Lu III DNA // J. Gen. Virol. — 1983.— 64, N 5.— P. 1043—1046.
24. Cotmore S. F., Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome // Science.— 1984.— 226, N 4679.— P. 1161—1165.

Киев. гос. ун-т

Получено 24.02.87