

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лазуркин Ю. С. Молекулярное плавление ДНК и эффект тонкой структуры кривых плавления // Молекуляр. биология.— 1977.— 11, № 6.— С. 1311—1324.
2. Fine structure of DNA melting curves / Yu. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii et al. // Biopolymers.— 1976.— 15, N 6.— P. 1019—1036.
3. Wada A., Yabuki S., Husimi Y. Fine structure in the thermal denaturation of DNA: high temperature resolution spectrophotometric studies // Crit. Rev. Biochem.— 1980.— 9, N 2.— P. 87—144.
4. Wartell R. M., Benight A. S. Thermal denaturation of DNA molecules: a comparison of theory with experiment // Phys. Repts.— 1985.— 126, N 2.— P. 67—107.
5. Vitek A., Reddy C. R., Pivec L. Numerical analysis of absorption curves of a multiphase shape by a computer // Biochim. et biophys. acta.— 1974.— 353, N 3.— P. 385—391.
6. Blake R. D., Lefoley S. G. Spectral analysis of high resolution direct-derivative melting curves of DNA for instantaneous and base composition // Ibid.— 1978.— 518, N 2.— P. 233—246.
7. Pavlov V. M., Lyubchenko Yu. L. A new method for recording of DNA differential melting curves // Biopolymers.— 1978.— 17, N 4.— P. 795—798.
8. High-resolution thermal denaturation of DNA. 1. Theoretical and practical considerations for the resolution of thermal subtransition / A. T. Ansevin, D. L. Vizard, B. W. Brown, J. McConathy // Ibid.— 1976.— 15, N 1.— P. 153—174.
9. Gabarro J. Numerical analysis of thermal denaturation of nucleic acids // Analyt. Biochem.— 1978.— 91, N 2.— P. 309—322.
10. Волков Е. А. Численные методы.— М.: Наука, 1982.— 254 с.
11. Gruenwedel D. W. Salt effects on the denaturation of DNA // Biochim. et biophys. acta.— 1974.— 340, N 1.— P. 16—30.
12. Карапетян А. Т., Вардеванян П. О., Франк-Каменецкий М. Д. Влияние концентрации ионов  $Na^+$  на теплоту перехода спираль—клубок // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 5.— С. 31—37.

Ереван, гос. ун-т  
Кировакан. гос. пед. ин-т

Получено 29.09.89

УДК 578.841:577.113:578.23

© Н. Ю. Мирюта, Л. И. Строковская, И. Н. Скуратовская, 1990

### СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБЛАСТЕЙ ИНТЕГРАЦИИ ДНК ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА И ДНК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В ГЕНОМЕ БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ

*Исследованы некоторые структурные характеристики мест связывания клеточных и вирусных последовательностей в ДНК большой воцинной моли (БВМ) пражской линии и в геноме вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) БВМ. Показана возможность ковалентной связи генома вируса с геномом БВМ. Исследование кинетических и термических фракций ДНК БВМ пражской линии с различными молекулярными массами методами молекулярной гибридизации позволило локализовать области, содержащие участки гомологии вирусной и клеточной ДНК в вирусном геноме и исследовать области вирусной ДНК, прилегающие к клеточной. На основании проведенных исследований предложена модель интеграции геномов ВЯП БВМ и БВМ пражской линии.*

**Введение.** Вирусносительство широко распространено у чешуекрылых насекомых и проявляется под влиянием физических, химических и биологических факторов. Различные популяции большой воцинной моли (БВМ) отличаются по способности к активации в них латентного вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) БВМ. У БВМ пражской линии, например, не наблюдается ни спонтанный, ни индуцированный ядерный полиэдроз. Предполагалось, что у нее нет латентного вируса. Предположение о носительстве вирусных геномов этими насекомыми возникло, в частности, для объяснения результатов экспериментов по заражению насекомых БВМ пражской линии чужеродными ВЯП. При этом через несколько пассажей образовывались полиэдры, по форме характерные для ВЯП БВМ [1]. Продолжая начатые исследования [2], в этой работе мы изучали физическое состояние вирусного генома в клет-

ке и некоторые структурные характеристики нуклеотидных последовательностей, окружающих стыки вирусной и клеточной ДНК в геномах клетки и вируса.

**Материалы и методы.** В работе использовали ДНК личинок и гены БВМ пражской линии и ДНК ВЯП БВМ штамма М1, описанного в работе [3]. Суперспиральную ДНК ВЯП БВМ получали центрифугированием лизата в градиенте плотности хлористого цезия с бромистым этидием. Высокополимерную клеточную ДНК выделяли из гены или ядер личинок БВМ фенольно-детергентным методом.

Для построения физической карты генома ВЯП БВМ использовали метод двойной переварки рестриктазами *SmaI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI* [4, 5]. Расположение фрагментов карты корректировали с помощью гибридизации с индивидуальными клонированными фрагментами ВЯП БВМ в качестве зондов.  $^{32}P$ -ДНК с удельной активностью  $10^7-4 \cdot 10^8$  имп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$  получали методом ник-трансляции [6].

Препараты клеточной ДНК фрагментировали с помощью ультразвука в течение 0,5; 2; 15 мин при мощности 150 Вт и частоте 20 кГц. Молекулярную массу оценивали с помощью метода электронной микроскопии. Полученные препараты фракционировали.

Кинетические фракции (фракция, обогащенная повторами,  $C_0T < 1,5$ , и фракция, обогащенная уникальной ДНК  $C_0T > 1,5$ ) получали, отжигая денатурированную ДНК в 0,12 М натрий-фосфатном буфере до  $C_0T = 1,5$  и фракционируя ее на оксипатите при 60 °С [7]. Аликвоту фракции, обогащенной повторами, обрабатывали *SI*-нуклеазой при 37 °С в течение 45 мин [8].

Термическое фракционирование клеточной ДНК проводили в 0,06 М натрий-фосфатном буфере, ступенчато повышая температуру.

Количественное содержание вирусной ДНК во фракциях клеточной ДНК определяли с помощью методов кинетики реассоциации и точечной гибридизации [9, 10]. Количество вирусных эквивалентов в геноме клетки оценивали с помощью метода кинетики реассоциации по формуле

$$N = (t_{1/2p}/t_{1/2} - 1) aMC_p/CM_p,$$

где  $M$  — размер генома клетки;  $M_p$  — размер генома вируса;  $C$  — концентрация клеточной ДНК;  $C_p$  — концентрация меченой вирусной ДНК;  $a$  — поправка, определяемая из реконструкционного опыта;  $t_{1/2}$  — время реассоциации 50 % меченой вирусной ДНК в присутствии исследуемой клеточной ДНК;  $t_{1/2p}$  — то же в присутствии тимусной ДНК теленка (отрицательный контроль) [9]. При использовании метода гибридизации в растворе [9] во время исследования термических фракций клеточной ДНК подбирали пары значений  $X_i$ ,  $r_i$ , наиболее соответствующие экспериментальным кривым ( $i$  — номер фракции;  $X_i$  — доля вирусного генома, присутствующая во фракции  $i$ ;  $r_i$  — молярное отношение вирусных нуклеотидных последовательностей во фракции  $i$  к меченой вирусной ДНК), с помощью формулы, приведенной в [11]:

$$1/f_{ss,i} = \left[ \frac{X_i}{1 + (r_i + 1)t/t_{1/2p,i}} + \frac{1 - X_i}{1 + t/t_{1/2p,i}} \right]^{-1},$$

при условии нормировки  $\sum_i X_i = 1$ . Для исследования того, какие фрагменты вирусной ДНК присутствуют в изучаемых фракциях клеточной ДНК, использовали метод гибридизации на фильтрах [12].

**Результаты и обсуждение.** Построение физической карты генома ВЯП БВМ. Физическая карта была построена методом одиночных и двойных переварок с использованием рестриктаз *SmaI*, *HindIII*, *EcoRI* на основе имеющейся карты по *SmaI* и *BamHI* [4]. Использование алгоритма, предложенного Фитчем [5], позволило выбрать вариант карты с наименьшими среднеквадратическими погрешностями. На рис. 1 представлен вариант карты, скорректированный с помощью гибридизации на фильтрах и использованием в качестве зондов ряда *BamHI* и *EcoRI*-фрагментов.

Обнаружение вирусных нуклеотидных последовательностей в геноме БВМ. Для обнаружения и оценки количества вирусных нуклеотидных последовательностей в препаратах клеточной ДНК БВМ были проведены опыты по кинетике реассоциа-

ции высокоочищенной ДНК ВЯП БВМ в присутствии тимусной ДНК (отрицательный контроль), тимусной и известного количества вирусной ДНК (положительный контроль) и ДНК пражской линии. Результаты одного из экспериментов приведены на рис. 2. Статистическая обработка значений количества вирусных эквивалентов на геном клетки, полученных в 10 экспериментах, показала, что на геном БВМ пражской линии приходится  $2,0 \pm 1,0$  геном ВЯП БВМ.

Методом блот-гибридизации по Саузерну также показано присутствие вирусспецифических последовательностей. Отсутствие некоторых фрагментов вирусной ДНК можно объяснить деградацией части фрагментов клеточной ДНК при выделении, так как способы выделения

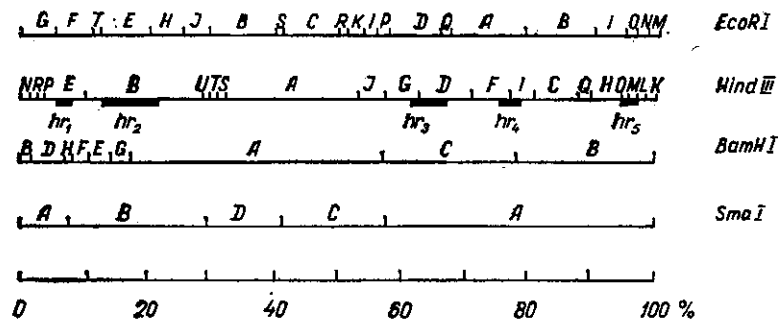


Рис. 1. Физическая карта генома ВЯП БВМ. Утолщенными линиями обозначены области, содержащие гомологичные клеточным последовательности

Fig. 1. Physical map of the *Galleria mellonella* NPV genome. Regions containing homology sequences are indicated by open boxes

препаратов вирусной и клеточной ДНК отличаются. Однако тот факт, что появился ряд новых полос, в том числе соответствующих более крупным фрагментам, чем самый большой фрагмент вирусной ДНК (рис. 3), позволяет нам интерпретировать эти данные следующим образом. Сравнение радиоавтографов, полученных при гибридизации продуктов гидролиза *Bam*HI и *Eco*RI клеточной и вирусной ДНК с  $^{32}$ P-ДНК ВЯП БВМ, продемонстрировало, что в препарате клеточной ДНК наблюдались некоторые отличия по отношению к вирусной ДНК: не обнаруживаются полосы, соответствующие *Eco*RI-A, D, F, H, I, N, O, Q- и *Bam*HI-A, C, D, E, F, G, H-фрагментам, и появились новые полосы (рис. 3). Гибридизация  $^{32}$ P-ДНК ВЯП БВМ с *Bam*HI- и *Eco*RI-фрагментами тимусной ДНК не наблюдалась, проведен контроль на полноту переварки (данные не приведены). Полученные данные могут свидетельствовать или об интеграции вирусной и клеточной ДНК в геноме БВМ, или о модификации вирусных нуклеотидных последовательностей в клетке. Чтобы разобраться в этом вопросе, мы провели эксперименты с целью получения фракций клеточной ДНК, содержащих стыки вирусных и клеточных нуклеотидных последовательностей.

Структурные характеристики областей интеграции вирусной и клеточной ДНК в геномах вируса и клетки. Исходя из того, что в зависимости от времени фрагментации ультразвуком можно выделить несвязанные между собой фрагменты вирусной и клеточной ДНК и фрагменты, которые с большей вероятностью содержат и вирусную, и клеточную ДНК [13], получили препараты клеточной ДНК с фрагментами различной молекулярной массы ( $\cdot 10^6$ ): 0,04—0,4 ( $M_3$ ), 0,2—1,0 ( $M_2$ ) и 0,4—1,5 с отдельными молекулами 3—5 ( $M_1$ ).

Исследование кинетических фракций в препаратах  $M_3$ ,  $M_2$ ,  $M_1$  показало, что при увеличении размера молекул увеличивается доля фракции ДНК, обогащенной повторами, увеличивается также содержание вирусной ДНК в ней (0,10; 0,35; 0,87 вирусного генома). Обработанная *SI*-нуклеазой эта обогащенная повторами фракция содержит 0,10; 0,10;

0,04 генома ВЯП в  $M_3$ ,  $M_2$ ,  $M_1$  соответственно (рис. 1). Из этих результатов видно, что в  $M_3$  практически все повторяющиеся последовательности не связаны с уникальными последовательностями вирусной ДНК. Таким образом, вирусные и клеточные нуклеотидные последовательности препарата ДНК  $M_3$  распределяются независимо друг от друга и могут служить контролем по этому признаку. Количественное содержание ДНК вируса во фракциях клеточной ДНК, обогащенных повторами, в  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  указывает на то, что в случае интеграции вирусных и клеточных последовательностей и в вирусном, и в клеточном геномах образуются, скорее всего, структуры с перемежающимися вирусными и клеточными последовательностями, так как макси-

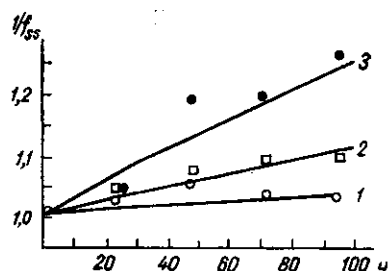


Рис. 2. Обнаружение вирусных нуклеотидных последовательностей в клеточной ДНК БВМ: кинетика реассоциации  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ (0,02 мкг/мл) в присутствии тимусной ДНК (180 мкг/мл) (1), ДНК БВМ пражской линии (180 мкг/мл) (2), тимусной ДНК (180 мкг/мл) и ДНК ВЯП БВМ (0,25 мкг/мл) (3)

Fig. 2. Detection of viral nucleotide sequences in *G. mellonella* cell DNA preparation: reassociation kinetics of  $^{32}\text{P}$ -labelled *G. mellonella* NPV DNA (0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence of calf thymus DNA (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (1), *G. mellonella* DNA of Prague stock (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (2), calf thymus DNA (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and *G. mellonella* NPV DNA (0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (3)

Рис. 3. Исследование вирусных нуклеотидных последовательностей в препаратах ДНК БВМ пражской линии: а — гибридизация по Саузерну  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ (0,1 мкг) с ДНК БВМ (15 мкг), обработанной *EcoRI* (1); ДНК ВЯП БВМ (10 нг), обработанной *EcoRI* (2); ДНК ВЯП БВМ (10 нг), обработанной *BamHI* (3); ДНК БВМ (15 мкг), обработанной *BamHI* (4), ДНК ВЯП БВМ (2 нг), обработанной *BamHI* (5); б — схематическое представление этого радиоавтографа. Гибридизация  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ с ДНК тимуса теленка, обработанной *EcoRI* и *BamHI*, не наблюдалась

Fig. 3. Research of virus nucleotide sequences in *G. mellonella* cell DNA preparation: а — Southern hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labelled *G. mellonella* NPV DNA (0.1  $\mu\text{g}$ ) with *G. mellonella* DNA (15  $\mu\text{g}$ ) cleaved by *EcoRI* (1), *G. mellonella* NPV DNA (10 ng) cleaved by *EcoRI* (2), *G. mellonella* NPV DNA (10 ng) cleaved by *BamHI* (3), *G. mellonella* DNA (15  $\mu\text{g}$ ) cleaved by *BamHI* (4), *G. mellonella* NPV DNA (2 ng) cleaved by *BamHI* (5), б — scheme of this radioautograph. Hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labelled *G. mellonella* NPV DNA with calf thymus DNA cleaved by *EcoRI* and *BamHI* has not been detected

мальный размер фрагментов в  $M_2$  и  $M_1$   $(1,0-1,5) \cdot 10^6$  (иногда в  $M_1$   $(3-5) \cdot 10^6$ ) при количестве полных копий вирусного генома в клеточном 2—3 (размер вирусного генома  $100 \cdot 10^6$ ). Поэтому, вероятно, с клеточными нуклеотидными последовательностями перемежаются неполные вирусные геномы.

Поскольку геном вируса содержит повторяющиеся последовательности (рис. 4) и учитывая возможность распределения уникальных вирусных последовательностей во фракцию с  $10^{-2} < C_0T < 1,5$  [14], мы ло-

кализовали на карте генома ВЯП области, содержащие повторяющиеся последовательности, используя в качестве зонда фракцию клеточной ДНК, обогащенную повторами, обработанную *SI*-нуклеазой. В опытах по гибридизации этого зонда с продуктами гидролиза вирусной ДНК *HindIII* обнаружена гибридизация с *HindIII*-*B*, *D*, *E*, *F*, *G*, *I*, *M*, *O*. Из этих опытов и количественных исследований, приведенных выше, следует, что эти *HindIII*-фрагменты содержат вирусные нуклеотидные последовательности, вероятно, гомологичные клеточным и представляющие

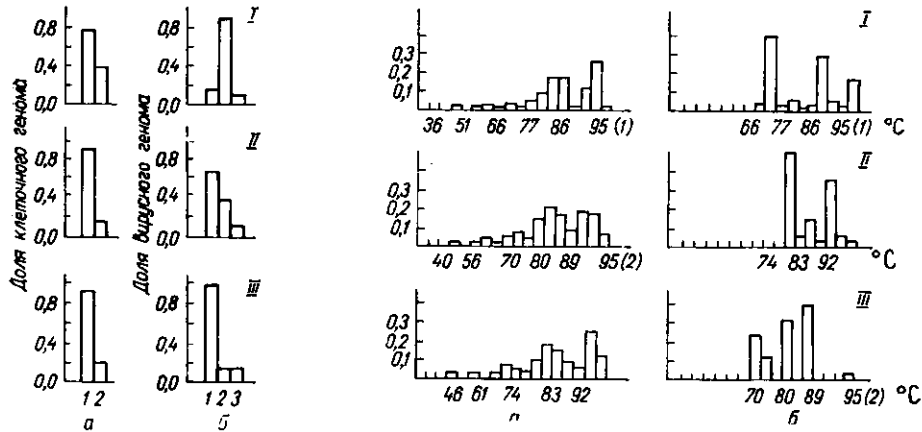


Рис. 4. Распределение клеточной (а) и вирусной (б) ДНК по кинетическим фракциям клеточной ДНК БВМ (I — ДНК с  $C_0T > 1,5$ ; 2 — ДНК с  $C_0T < 1,5$ ; 3 — ДНК с  $C_0T < 1,5$ , обработанная *SI*-нуклеазой); I — ДНК  $M_1$  (обработанная ультразвуком (УЗ) в течение 0,5 мин); II — ДНК  $M_2$  (обработанная УЗ в течение 2 мин); III — ДНК  $M_3$  (обработанная УЗ в течение 15 мин)

Fig. 4. Distribution of the cell (a) and virus (б) DNA on kinetic *G. mellonella* DNA fractions (I — DNA with  $C_0T > 1,5$ , 2 — DNA with  $C_0T < 1,5$ , 3 — the latest one cleaved by *SI* nuclease) I — *G. mellonella* DNA ultrasonicated through 0.5 minutes ( $M_1$ ), II — *G. mellonella* DNA ultrasonicated through 2 minutes ( $M_2$ ), III — *G. mellonella* DNA ultrasonicated through 15 minutes ( $M_3$ )

Рис. 5. Диаграммы распределения клеточной (а) и вирусной (б) ДНК по термическим фракциям: I — ДНК  $M_1$ ; II — ДНК  $M_2$ ; III — ДНК  $M_3$

Fig. 5. Distribution diagrams of the cell (a) and virus (б) DNA on thermal *G. mellonella* DNA fractions: I — DNA  $M_1$ , II — DNA  $M_2$ , III — DNA  $M_3$

собой, по крайней мере частично, повторы. Сопоставляя полученные результаты с физической картой генома ВЯП БВМ (рис. 1), можно сказать, что в вирусном геноме существует несколько областей, гомологичных клеточным последовательностям. Эти области содержат части перечисленных фрагментов  $hr_1$  — *HindIII*-*E*;  $hr_2$  — *HindIII*-*B*;  $hr_3$  — *HindIII*-*G*, *D*;  $hr_4$  — *HindIII*-*F*, *I*;  $hr_5$  — *HindIII*-*O*, *M* (рис. 1).

Клеточную ДНК БВМ фракционировали также по нуклеотидному составу с помощью термического фракционирования. Известно, что вирусная ДНК элюирует при термическом фракционировании в относительно узком интервале температур по сравнению с клеточной [15]. Профиль распределения тотальной ДНК по термическим фракциям при изменении  $M$  в наших экспериментах практически не изменился (рис. 5). Эксперименты по кинетике реассоциации  $^{32}P$ -ДНК ВЯП БВМ в присутствии ДНК термических фракций позволили оценить параметры  $X_i$  и  $r_i$  для фракций препаратов  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  при условии, что в клетке присутствует полный или почти полный геном вируса ( $\sum X_i = 1$ ). На рис. 5, б приведены диаграммы распределения долей вирусных геномов, содержащихся в термических фракциях препаратов  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ . Распределение вирусных нуклеотидных последовательностей в препаратах клеточной ДНК изменилось с изменением молекулярной массы с  $M_3$  до  $M_1$ : изменилось количество фракций, содержащих вирусные последовательности в  $M_1$  и  $M_2$  по сравнению с  $M_3$ , изменилось количественное распределение вирусной ДНК по фракциям. Исследование ко-

личества и перемещения «новых» вирусосодержащих фракций, а также количественного перераспределения вирусных нуклеотидных последовательностей между ними в препаратах клеточной ДНК  $M_1$  и  $M_2$  по

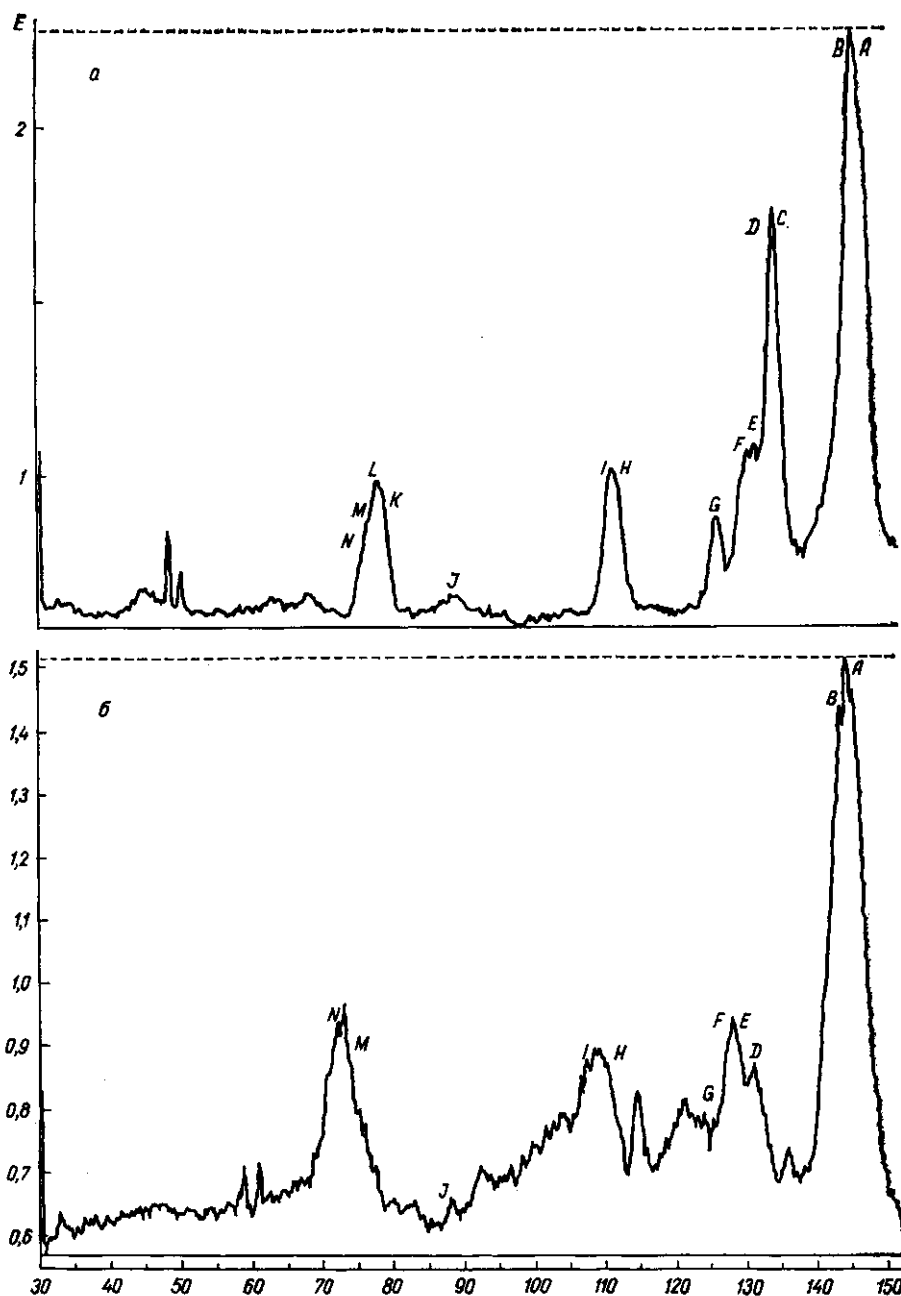


Рис. 6. Обнаружение фрагментов вирусной ДНК, гибридирующихся с ДНК фракции 95(1) в препарате  $M_1$ , которая не содержит вирусной ДНК в  $M_3$ : денситограммы радиоавтографов, полученных при гибридизации  $^{32}\text{P}$ -ДНК ВЯП БВМ (а) и  $^{32}\text{P}$ -ДНК фракции 95(1) (б) с ДНК ВЯП БВМ, обработанной *HindIII*

Fig. 6. Detection of virus DNA fragments hybridized with 95(1) DNA fraction in  $M_1$  preparation which contains no virus DNA in  $M_3$ : densitograms of radioautographs obtained under hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labelled *G. mellonella* NPV DNA (a) and  $^{32}\text{P}$ -labelled 95(1) cell DNA fraction (b) with *G. mellonella* NPV DNA cleaved by *HindIII*

сравнению с  $M_3$  позволяет предположить, что, вероятно, обнаружена ковалентная связь вирусной ДНК с несколькими областями клеточной ДНК, которые характеризуются температурами плавления 77; 89—95 °С. Фракции 89 °С для  $M_1$  и 92 °С для  $M_2$  содержат около 30 % ви-

русного генома, остальные из перечисленных фракций содержат 1,5—2 % вирусного генома, кроме фракции 95 (2), представляющей собой ДНК, не расплавившуюся при 95 °С в 0,06 М фосфатном буфере, которая содержит в  $M_1$  около 16 % вирусного генома (рис. 5).

Для исследования вирусных нуклеотидных последовательностей, прилегающих к клеточной ДНК, гибридизовали термические фракции клеточной ДНК (в качестве зонда) с *HindIII*-фрагментами ДНК ВЯП БВМ. Во фракциях 89—95 °С в  $M_1$  и  $M_2$  обнаружены, например, вирусные нуклеотидные последовательности, входящие в области гомологии  $hr_2$  и  $hr_3$  и прилегающие к *HindIII*-A, J (рис. 6). Сопоставление

Рис. 7. Выявление области числа стыков вирусных и повторяющихся клеточных последовательностей ДНК ( $n$ ), наиболее соответствующих экспериментальным данным: теоретическая зависимость количества вирусной ДНК, перешедшей во фракцию клеточной ДНК, обогащенную повторами, при увеличении размеров молекул с  $M_3$  до  $M_1$  для фрагментов ДНК размером  $(1-5) \cdot 10^6$ , предположительно содержащих участки  $(0,75-4) \cdot 10^6$  последовательностей вирусной ДНК (1, 2), для фрагментов размером до  $1 \cdot 10^6$ , содержащих участки  $(0,5-0,75) \cdot 10^6$  последовательностей вирусной ДНК (2, 3). Пересечение теоретических линий с экспериментальными (4, 5) позволяет оценить область наиболее вероятных значений числа стыков

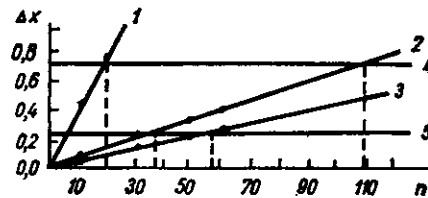


Fig. 7. Determination of the number of linking region ( $n$ ) of virus and repeated cell nucleotide sequences corresponding to the greatest extent to experimental data: theoretical dependence of the quantity of virus DNA moved into repeat-rich cell fraction with the growth of the fragment molecular sizes from  $M_3$  to  $M_1$  for DNA fragments with sizes of 1-5 MDa possibly containing sequences of virus DNA of 0.75-4 MDa (1, 2), for DNA fragments with sizes to 1 MDa containing 0.5-0.75 MDa of virus nucleotide sequences (2, 3). Intersection of theoretical lines with experimental ones (4, 5) allows estimating the region of the most probable  $n$  values

результатов гибридизации с картой вирусного генома позволило прийти к следующим выводам. Согласно правилу, по которому первичная интеграция происходит по областям с близким нуклеотидным составом [16], по крайней мере часть каждой из пяти областей, содержащих области гомологии, близка по нуклеотидному составу фракциям, соответствующим 89, 92 °С. Если учесть, что эта фракция содержит около 30 % вирусного генома, то можно допустить возможность связи вирусных и клеточных последовательностей по всем областям гомологии в различных сайтах с соответствующим составом, а, возможно, и по другим последовательностям, расположенным недалеко от областей гомологии. Часть этих областей соответствует по составу фракции 77 °С, фракциям 83 и 95 (1) °С соответствуют части всех областей гомологии. Фракция 95 (2) в препаратах  $M_2$  и  $M_3$  содержит 2—3 % вирусного генома, тогда как в  $M_1$  — 16 %. Эта фракция гибридизуется со всеми областями гомологии и прилегающими к ним областями в  $M_1$ , а также с 2—3 областями в  $M_2$  и  $M_3$ , которые отличаются от вирусных последовательностей, обнаруженных в  $M_1$ .

Таким образом, показано, что ДНК ВЯП содержит области, гомологичные клеточным. Однако во фракциях клеточной ДНК в  $M_1$  и  $M_2$ , содержащих по сравнению с  $M_3$  вирусные нуклеотидные последовательности, присутствуют не только области гомологии, но и прилегающие к ним фрагменты вирусного генома. Эти данные можно интерпретировать как ковалентную связь между вирусными и клеточными последовательностями в геноме БВМ пражской линии.

Выбор модели интеграции. Рассмотрим возможные модели интеграции вирусной и клеточной ДНК в клеточном геноме: интеграция вирусных копий в виде тандема голова-к-хвосту с повторяющимися последовательностями клеточной ДНК ( $n=2$ ); интеграция вирусных геномов с повторяющейся клеточной ДНК в виде отдельных копий ( $n=2k+2$ ); интеграция вирусных нуклеотидных последовательностей с повторяющейся клеточной ДНК в виде неполных копий вирус-

ного генома независимо друг от друга ( $n > 2k + 2$ ), где  $n$  — количество стыков вирусной и повторяющейся клеточной ДНК,  $k$  — число копий интегрированной вирусной ДНК.

Для выбора одной из этих моделей, а также для оценки значения  $n$  в выбранной модели рассмотрим зависимость количества вирусной ДНК, перераспределившейся между фракциями клеточной ДНК ( $\Delta X_i$ ,  $\Delta X_i = X_{M_i} - X_{M_3}$ ,  $i = 1, 2$ ), от количества стыков вирусной и повторяющейся клеточной ДНК ( $n$ ). Пусть в клеточной ДНК имеется  $n$  стыков вирусной и клеточной ДНК и три набора фрагментов клеточной ДНК  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ . В  $M_3$  распределение по кинетическим фракциям клеточной ДНК, вирусной и клеточной ДНК происходит практически независимо. В крупных фрагментах наборов  $M_1$  и  $M_2$  можно обнаружить стыки вирусной и клеточной ДНК экспериментально, так как количество перераспределившейся вирусной ДНК между фракциями клеточной ДНК является функцией числа стыков. Построим функции  $\Delta X(n)$  для случаев, когда вирусная ДНК составляет 0,75 размера наибольшего фрагмента ( $5 \cdot 10^6$ ) и 0,5 размера фрагмента  $1,5 \cdot 10^6$  ( $M_1$ ) и 0,75 и 0,5 размера фрагмента  $1 \cdot 10^6$  ( $M_2$ ). Ограниченные этими линиями множества представляют собой промежуточные случаи. Экспериментально полученные значения  $X_1 = 0,75$  и  $X_2 = 0,25$  в  $M_1$  и  $M_2$  соответственно позволяют ограничить множества возможных значений  $n$  и найти их пересечение, которое представляет собой множество подходящих значений для нашей модели (рис. 7). Таким образом, был оценен интервал возможных значений  $n$   $36 \div 58$ . Величину нижнего значения можно интерпретировать как интеграцию двух копий вирусной ДНК с 17—18 сайтами клеточной ДНК в виде неполных копий вирусного генома, по-видимому, вблизи областей гомологии. Сравнивая эту модель интеграции геномов ВЯП БВМ и БВМ пражской линии с обычно встречающейся моделью интеграции голова-к-хвосту в трансформированных клетках, можно предположить, что подобная конструкция появилась в процессе эволюции трансформированного некогда генома БВМ пражской линии за счет осуществления ряда последовательных транспозиций клеточной ДНК в вирусную и наоборот.

#### STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE INTEGRATION REGIONS OF NPV DNA AND HOST CELL IN THE *GALLERIA MELLONELLA* GENOME

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

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

#### Summary

The physical state of the viral genome in the cell and certain structural characteristics of binding sites of virus and cell sequences in *Galleria mellonella* DNA and NPV DNA have been investigated. The possibility of covalent bond between genome DNAs of virus and cell is shown. The studies of kinetic and thermal fractions obtained from *G. mellonella* larvae of the Prague stock for DNA with different weights have permitted localizing NPV DNA regions containing homology regions, showing linkage between virus and cell DNA in the cell genome, investigating virus DNA regions adjacent to cell DNA. This DNA proved to contain homology regions and neighbouring virus DNA fragments. A model of integration of NPV genome with *G. mellonella* larvae genome has been suggested.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aizawa K. Infection of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus) with the polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus) // J. Insect. Pathol.— 1962.— 4, N 2.— P. 122—127.
2. Обнаружение ковалентно связанного с ДНК клетки генома бакуловируса у большой вошнной моли / Н. Ю. Мирюта, Л. И. Строковская, И. П. Кок, И. Н. Скуратовская // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 2.— С. 106—108.



3. Кок И. П., Скуратовская И. Н., Строчковская Л. И. Молекулярные основы репродукции бакуловирусов.— К.: Наук. думка, 1980.— 173 с.
4. Строчковская Л. И. Физическое картирование генома бакуловирусов // Методы молекуляр. биологии.— К.: Наук. думка, 1986.— С. 73—80.
5. Fitch W. M., Smith T. F., Ralph W. M. Mapping the order of DNA restriction fragments // Gene.— 1983.— 22, N 1.— P. 19—29.
6. Labelling DNA to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I / P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg // J. Mol. Biol.— 1977.— 113, N 1.— P. 251—273.
7. Реассоциация ДНК: физические и биологические аспекты / В. И. Прима, В. З. Тарантул, А. В. Шугалий, К. Г. Газарян // Укр. биохим. журн.— 1974.— 46, № 2.— С. 255—269.
8. Вольфсон В. Г., Борхсениус С. Н. Распределение повторяющихся нуклеотидных последовательностей в ДНК макронуклеуса инфузории *Tetrahymena* // Молекуляр. биология.— 1978.— 12, № 4.— С. 894—900.
9. Gelb L. D., Kohne D. E., Martin M. A. Quantitation of simian virus sequences in african green monkey, mouse and virus transformed cell genomes // J. Mol. Biol.— 1971.— 57, N 1.— P. 129—145.
10. Fotis C. K., Weldon C. J., Argiris E. Determination of nucleic acid sequence homologues and relative concentrations by a dot hybridization procedure // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1541—1552.
11. Kraiselburd E., Gage L. R., Weissbach A. Presence of herpes simplex virus DNA fragment in an L-cell clone obtained after infection with irradiated herpes simplex virus 1 // J. Mol. Biol.— 1975.— 97, N 3.— P. 533—542.
12. Smith G. E., Summers M. D. The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl-paper // Anal. Biochem.— 1980.— 109, N 1.— P. 123—129.
13. Shoyab M., Dastoor M. N., Baluda M. A. Evidence for tandem integration of avian myeloblastosis virus DNA with endogenous provirus in leukemic chicken cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1976.— 73, N 5.— P. 1749—1753.
14. Мартыненко Е. И. Изучение физико-химических свойств и биосинтеза ДНК вируса ядерного полиедроза непарного шелкопряда: Автореф. дис. канд. биол. наук.— Киев, 1988.— 20 с.
15. Скуратовская И. Н., Шугалий А. В., Никоненко В. И. Выделение и анализ ДНК из полиэдров при ядерном полиедрозе большой воцинной моли // Докл. АН УССР. Сер. биология.— 1974.— № 10.— С. 932—934.
16. Genomic localization of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line / M. Zerial, J. Salinas, J. Filipski, G. Gernardi // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 21.— P. 8373—8386.

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

Получено 18.08.89

УДК 577.217.34

© Т. В. Венкстерн, Д. М. Грайфер, Г. Г. Карпова, И. А. Морозов, 1990

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНОГО тРНК<sup>Phe</sup>, НЕСУЩЕГО АРИЛАЗИДОГРУППУ НА ОСТАТКЕ G<sub>24</sub>, С РИБОСОМАМИ *ESCHERICHIA COLI* И тРНК-(АДЕНИН-1-) МЕТИЛТРАНСФЕРАЗой ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*

С помощью производного тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli*, несущего арилазидогруппу на остатке G<sub>24</sub>, изучена фотоаффинная модификация рибосом *E. coli* и тРНК-(аденин-1-)метилтрансферазы из *T. thermophilus*. Показано, что производное тРНК при облучении УФ-светом ( $\lambda > 310$  нм) ковалентно присоединяется к тРНК-(аденин-1-)метилтрансферазе, но не присоединяется к рибосомам при локализации как в А-, так и в Р-участке.

**Введение.** Одним из подходов к изучению структурной организации и динамики комплексов тРНК с рибосомами и ферментами является метод аффинной модификации реакционноспособными производными тРНК. Особенно плодотворным оказалось использование фотоактивируемых производных тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli*, содержащих арилазидогруппы, распределенные примерно статистически по остаткам гуанина — (азидо)стат-тРНК<sup>Phe</sup>. Эти производные получали в две стадии: вначале