

## Фізичне картування геному MS2-похідного ДНК-вмісного фага P23-2 та виявлення в ньому MS2-специфічних послідовностей

Н. Ю. Мірюта, Г. Ю. Мірюта, Т. П. Перерва

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

---

*Побудовано фізичну карту одного з представників групи ДНК-вмісних фагів, виділених з клітин MS2-індукованих мутантів Escherichia coli 23-2. Локалізовано сайти для рестриктаз HindIII, PstI, PvuII, BamHI, EcoRI, SmaI. Визначено розмір геному фага, який складає 40 тис. пар нуклеотидів. Здійснено аналіз наявності MS2-специфічних послідовностей у геномі цього фага за допомогою методу гібридизації.*

---

Вступ. РНК-вмісні бактеріофаги, в тому числі й фаг MS2, відносяться до найвивченіших біологічних об'єктів. У значній мірі це пояснюється властивостями їхньої віріонної РНК, представленій стійкою та функціонально повноцінною мРНК, що в свій час було успішно використано для вивчення механізмів регуляції білкового синтезу. Завдяки цій обставині основні дані стосовно біології РНК-вмісних бактеріофагів було отримано вже протягом перших 10 років після їхнього відкриття [1]. Досконало вивчено генетику РНК-вмісних бактеріофагів, їхні відносини з клітиною-хазяїном, первинну структуру РНК, синтез фагових білків, а також реплікацію фагової РНК. При цьому чітко показано, що реплікація РНК-вмісних бактеріофагів не пов'язана з необхідністю утворення ДНК-вмісних структур і не супроводжується явищами, описаними для ретровірусів, — вбудовуванням ДНК-копій у хромосому клітини та утворенням варіантів вірусних часточок, що містили б кДНК як генетичний матеріал.

Незважаючи на відсутність подібних даних, нами було показано в роботах [2, 3], що РНК бактеріофага MS2 у процесі реплікації в інфікованій клітині все-таки здатна вступати в контакт з хромосомою хазяїна на рівні фізичного об'єднання фагового геному з клітинною ДНК. Це призводить

до виникнення серії MS2-індукованих мутантів *Escherichia coli*. Наступні дослідження [4, 5] показали, що в клітинах цих MS2-індукованих мутантів продукуються з низькою частотою ДНК-вмісні бактеріофаги, які, за даними серологічних досліджень, могли б нести у своїх віріонах MS2-специфічну генетичну інформацію.

Нововиявлені фаги інактивуються MS2-антисироваткою у тій же мірі, що й нативний фаг, але мають іншу морфологію та розміри фагових часточок, що суттєво перевищують розміри MS2-часточок. Фаги подібного типу було виявлено не лише в клітинах MS2-індукованих мутантів *E. coli*, а й у клітинах — носіях відповідних P1- і  $\lambda$ -трансдукуючих бактеріофагів [5] та в препаратах фага MS2 (даних не наведено). Усі фаги, що входять до цієї групи, виявилися ідентичними за рестрикційною картиною та за відношенням до антиMS2-сироватки [5]. В даній роботі представлено докази присутності MS2-специфічної послідовності в геномі одного з представників досліджуваної групи ДНК-вмісних фагів, виділеного з клітин MS2-індукованого мутанту *E. coli* 23-2, та побудовано його фізичну карту для рестриктаз *HindIII*, *PstI*, *PvuII*, *BamHI*, *EcoRI*, *SmaI*.

**Матеріали і методи.** *Бактерії та бактеріофаги.* Клітини дикого типу *E. coli* AB 259 і Hfr 3000 (*E. coli* 3000) отримані з Інституту молекулярної біології РАН (Росія). Бактеріофаг MS2 отри-

мано також з Інституту молекулярної біології РАН, бактеріофаг P23-2 виділено нами раніше в процесі роботи з MS2-індукованим мутантом *E. coli* 23-2 [4]. Всі експерименти з бактеріофагами здійснювали за [6].

**Поживні середовища.** Використовували 1,2 та 0,6 %-й амінопептидний агар та амінопептидний бульйон.

**Плазміди.** Штам *E. coli*, який містить плазмиду рMS2-7 з клонованою в ній повною послідовністю кДНК MS2, люб'язно надано нам д-ром Р. Девосом [7].

**Виділення ДНК з бактеріофагів** проводили за стандартною методикою [8].

**Електрофорез в агарозному гелі та рестрикційний аналіз.** ДНК фага обробляли рестриктазами *HindIII*, *PstI*, *PvuII*, *BamHI*, *EcoRI*, *SmaI* окремо та в різних комбінаціях і розділяли електрофорезом в 0,7 %-му агарозному гелі з використанням трис-боратної буферної системи [8]. Молекулярні маси фрагментів визначали, порівнюючи їх з маркерною ДНК фага λ, розщепленою рестриктазами *HindIII* та комбінацією *HindIII*+*EcoRI* за [9].

**Гібридизація.** Фрагменти ДНК фага розділяли в 0,7 %-му агарозному гелі, переносили на нейлоновий фільтр (Hybond N, «Amersham», Велика Британія) за методом Саузерна [10]. Зонд мітили [<sup>32</sup>P]-dCTP з використанням стандартного набору (Nick-translation kit, «Sigma», США або «Biolab.»). Як зонд використано *SmaI-EcoRI*-фрагмент кДНК MS2 розміром 1,8 тис. п. н., вирізаний з плазміди рMS2-7.

**Результати і обговорення.** *Фізичне картування та визначення MS2-специфічної області в ДНК геному MS2-похідного фага.* Нижче описано фізичне картування фага P23-2 — одного з представників групи MS2-похідних фагів, виділеного з одночасного висіву *E. coli* 3000 та клітин MS2-індукованого мутанта зернистого типу *E. coli* 23-2, а також пошук MS2-специфічних послідовностей у геномі цього фага за допомогою методу гібридизації.

Фізичне картування здійснювали на основі вимірювання розмірів фрагментів рестрикції при простих та комбінованих обробках рестриктазами фагової ДНК. Розміри фрагментів визначали в тис. п. н. Ці ж дані було використано для визначення загального розміру фагового геному.

На першому етапі картування ДНК фага P23-2 переварювали рестриктазами *HindIII* та *EcoRI*, після чого *HindIII*- та *EcoRI*-фрагменти, виділені з гелю, обробляли: перші — рестриктазами *PstI* та *EcoRI*, другі — рестриктазами *PstI* та *PvuII*. Як виявилось, первинна обробка фагової ДНК ре-

стриктазою *HindIII* призводить до утворення трьох фрагментів — А, В і С, серед яких А-фрагмент розщеплюється *PstI* на два фрагменти розміром 20,3 і 10,3 тис. п. н., а обробка його *EcoRI* викликає появу дрібніших фрагментів — одного фрагмента розміром 22,3 тис. п. н., двох фрагментів, розмір кожного з яких складає біля 8,5 тис. п. н., і одного фрагмента розміром 1,2 тис. п. н. У складі *HindIII*В- та С-фрагментів сайтів рестрикції *PstI* і *EcoRI* не виявлено. Первинна обробка фагової ДНК рестриктазою *EcoRI* призводить до утворення двох фрагментів — А і В, причому *EcoRI*-А-фрагмент містить *PstI* фрагменти розміром 16,4; 13,3 і 10,6 тис. п. н. та *PvuII*-фрагменти розміром 16,4 і 2 × 10,6 тис. п. н. Прості обробки цілісної фагової ДНК рестриктазами *PvuII* та *PstI* також призводять в обох випадках до утворення трьох фрагментів, позначених А, В і С, причому розміри найбільших А-фрагментів також було визначено за допомогою переварювання іншими рестриктазами.

Обробка фагової ДНК рестриктазою *SmaI* дає три рівномірних за розміром фрагменти, сума молекулярних мас яких і відповідно розмір геному відповідають даним, отриманим при використанні решти рестриктаз. Розміри всіх фрагментів рестрикції, сукупність яких дозволила визначити загальний розмір геному фага P23-2 як загальну молекулярну масу цих фрагментів, наведено в табл. 1, а фізичну карту фагового геному, побудовану за результатами вимірювання фрагментів рестрикованої ДНК, — на рис. 1.

Аналіз присутності MS2-специфічних послідовностей в геномі фага P23-2 здійснювали з використанням <sup>32</sup>P-міченого *SmaI-EcoRI*-фрагмента

Таблиця 1  
Розміри рестрикованих фрагментів та геному фага P23-2

| Рестриктаза    | Фрагмент, тис. п. н. |      |      | Розмір геному (сумарна м. м. фрагментів) |
|----------------|----------------------|------|------|--|
|                | А                    | В    | С    |  |
| <i>HindIII</i> | 30,6*                | 8,5  | 1,0  | 40,1                                     |
| <i>PstI</i>    | 28,2*                | 10,6 | 1,5  | 40,3                                     |
| <i>PvuII</i>   | 27,2*                | 10,6 | 2,4  | 40,2                                     |
| <i>EcoRI</i>   | 39,6*                | 1,0  | —    | 40,6                                     |
| <i>SmaI</i>    | 15,3                 | 12,3 | 12,3 | 39,9                                     |
| <i>BamHI</i>   | —                    | —    | —    | —  |

\*Фрагменти, розмір яких був визначений як сума дрібніших фрагментів, отриманих після переварювання іншими рестриктазами; ←→ — сайт відсутній.

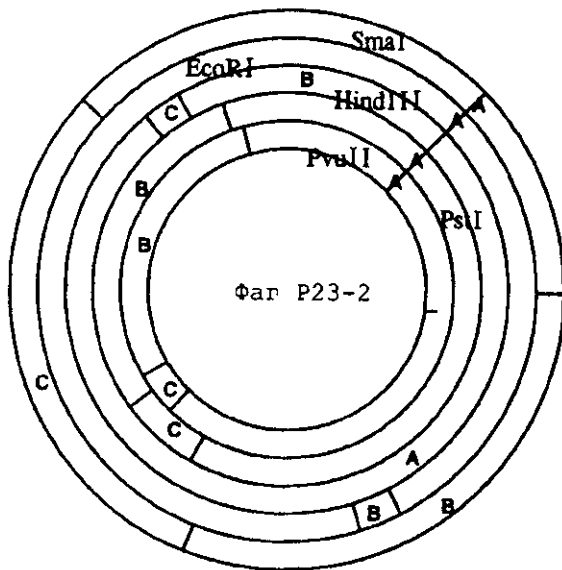


Рис. 1. Фізична карта геному фага P23-2 для рестриктаз *HindIII*, *PstI*, *PvuII*, *BamHI*, *EcoRI*, *SmaI*. Літерами позначено фрагменти, наведені в табл. 1

кДНК MS2 розміром 1,8 тис. п. н., виділеного з ДНК плазмиди *pMS2-7*. Блот-гібридизація цього зонда з ДНК фагів  $\lambda$ , P23-2 та з плазмідною *pMS2-7* показала відсутність гібридизації з фагом  $\lambda$  (негативний контроль, маркер), наявність гібридизації практично з усіма фрагментами *pMS2-7 + SmaI + EcoRI* (позитивний контроль, маркер) та наявність гібридизації з частиною фрагментів P23-2 + *SmaI + EcoRI*. Розміри фрагментів P23-2, здатних гібридуватися з зондом, розраховували за даними денситограми і порівнювали з даними, отриманими на основі електрофореграм рестрикованих фрагментів (табл. 2).

Вимірювання площ під піками денситограми (рис. 2) показало, що в позитивному контролі (фрагмент розміром 1,8 тис. п. н. у ДНК *pMS2-7*, рис. 2, а) та в дослідному варіанті (ДНК фага P23-2 розміром 40 тис. п. н., рис. 2, б) вони становлять 3,78 та 0,52 відн. од. відповідно. Кількість копій зондового фрагмента кДНК фага MS2, присутніх у ДНК фага P23-2, визначали за формулою:  $N = M_{\text{фага}} \cdot S_{\text{фага}} / M_{\text{фр}} \cdot S_{\text{фр}}$  [11]. Підставивши у формулу відповідні значення, маємо:  $N = 40 \cdot 0,52 / 1,8 \cdot 3,78 \approx 3,3$ .

Таким чином, фаг може містити 3—4 копії гомологічних зонду послідовностей (враховуючи,

Таблиця 2  
Результати блот-гібридизації ДНК фага P23-2 із *SmaI-EcoRI*-фрагментом кДНК MS2

| Розмір фрагментів P23-2 + <i>SmaI</i> + <i>EcoRI</i> згідно з даними |                             | Дольовий вміст зондової послідовності у фрагментах рестрикції ДНК фага P23-2 |
|--|-----------------------------|--|
| електрофореграми   | денситограми радіоавтографу |  |
| 15,3   | —                           | —  |
| 12,3   | 12,8                        | 0,34   |
| 6,6  | 6,0—9,5                     | 0,41   |
| 4,8  | 3,4—6,0                     | —  |
| 1,0  | 1,0                         | 0,25   |

що в лунку вносили однакову кількість препарату — по 1 мкг).

Порівнюючи дані, наведені в табл. 2, і розрахунки, згідно з якими геном досліджуваного фага P23-2 містить 3—4 копії фрагмента, який гібридується з частиною послідовності кДНК MS2, з розташуванням відповідних фрагментів на фізичній карті, слід відзначити, що послідовності, гомологічні MS2-специфічним послідовностям, розміщені в *EcoRI*-фрагменті та навколо нього і являють собою або тандем з 3—4 копій (рис. 3, а), або чередування MS2-специфічних з MS2-неспецифічними послідовностями (рис. 3, б). Другий варіант видається більш імовірним, враховуючи, що структура фага в цій області не є регулярною стосовно сайтів рестрикції, на що можна було б розраховувати у випадку тандема.

Отже, представлені в роботі результати з гібридизації підтверджують, що ДНК фага P23-2, одного з групи виявлених нами ДНК-вмісних бактеріофагів, здатних нейтралізуватися MS2-антисироваткою, дійсно містить у своєму складі MS2-специфічні послідовності. Враховуючи, що описані нами фаги виникають природним шляхом, факт їхнього існування значно розширює уявлення щодо поняття квазіспецифічності РНК-вмісних вірусів.

Як відомо, популяції РНК-вмісних вірусів представлені не одним типом геному певної структури, а являють собою гетерогенну суміш споріднених геномів (квазівиди). Завдяки високому темпові виникнення мутацій геноми квазівидових вірусних популяцій містять одну й ту саму так звану консенсусну послідовність, яка визначає їхню видову приналежність, але відрізняються один

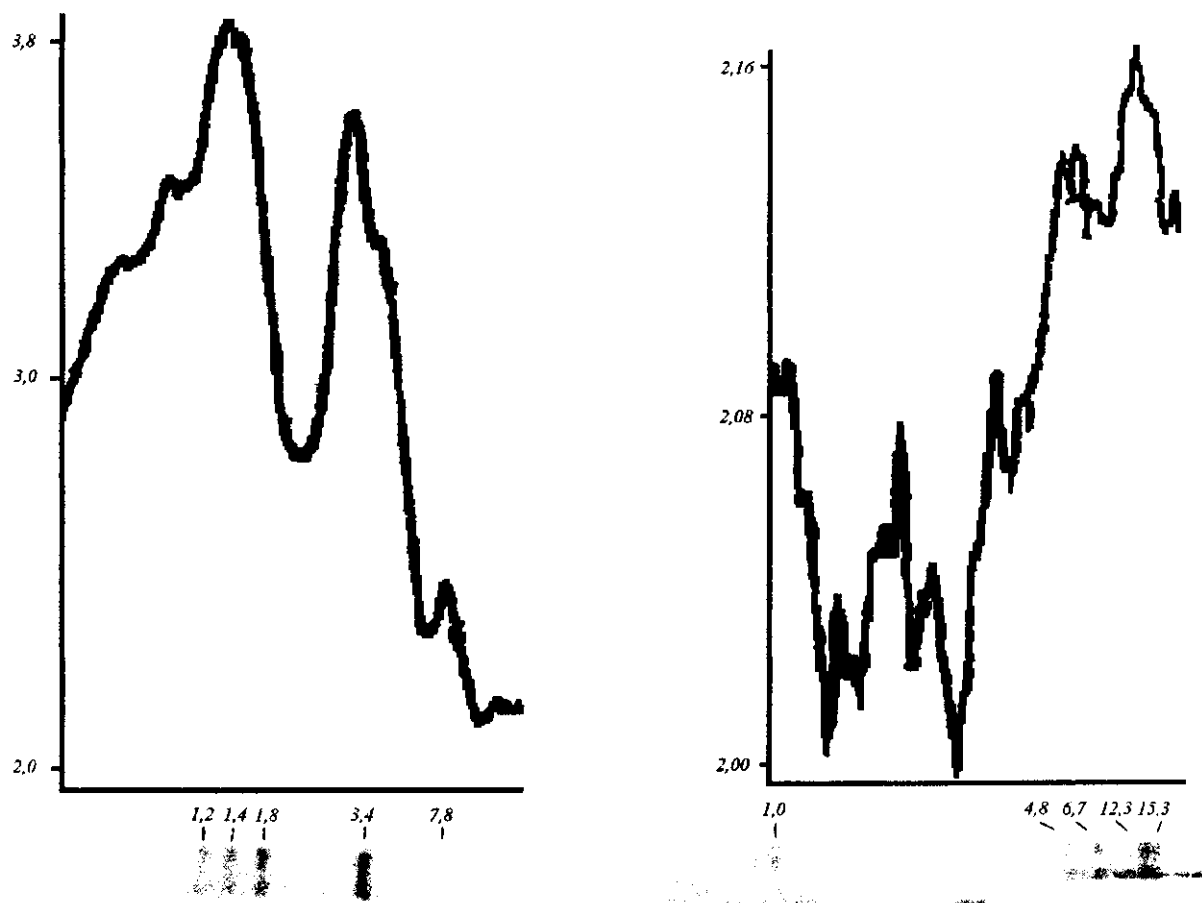


Рис. 2. Денситограма радіоавтографа (зверху) та відповідна електрофореграма (знизу) *pMS2-7 + SmaI + EcoRI* (а), *P23-2 + SmaI + EcoRI* (б) при гібридизації з зондом — фрагментом розміром 1,8 тис. п. н. *pMS2-7 + SmaI + EcoRI*

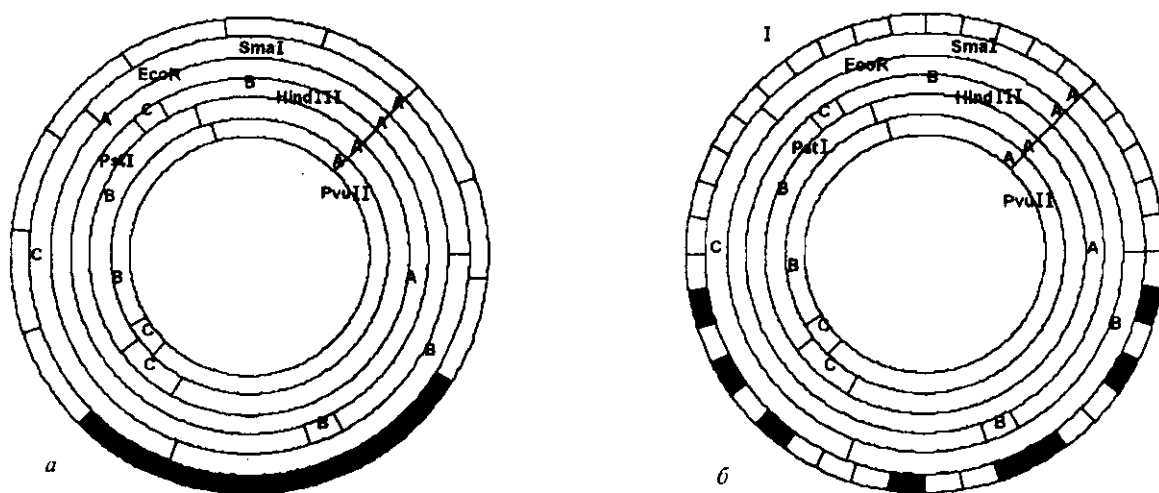


Рис. 3. Фізична карта геному фага P23-2 з двома варіантами ймовірного розташування MS2-специфічних послідовностей: а — тандемне; б — чергування з MS2-неспецифічними фаговими послідовностями

від одного і від консенсусної послідовності однією, кількома або багатьма мутаціями. Така квазіструктура популяцій РНК-вмісних вірусів має велике теоретичне та практичне значення, оскільки навіть одна мутація може змінити фенотип РНК-вірусу і стати початком ланцюжка подій, що ведуть до виникнення нових вірусних форм з новими властивостями. Це питання зараз широко вивчається методами секвенування, гібридизації, кДНК клонування, завдяки чому чітко встановлено, що більшість популяцій РНК-вмісних вірусів (квазівідів) містять всі можливі одиничні та подвійні мутації, а також різні пропорції потрійних, четвертинних і т. д. мутацій.

Великий внесок у ці дослідження зробило використання фага Q $\beta$  як моделі РНК-вмісного вірусу [12]. У той же час серед усіх цих досліджень відсутні напрямки, вивчення яких також могло б мати досить істотне значення для розуміння природи квазіструктури вірусних популяцій. Саме до таких явищ може бути віднесене виникнення нових типів вірусів за рахунок їхньої взаємодії з геномом інфікованої клітини.

Враховуючи, що фаз P23-2 має хвостовий відросток [5], відсутній у фага MS2, а його геном містить досить значну ДНК-послідовність, незв'язану з MS2-специфічними ділянками, логічно припустити, що в утворенні фазів такого типу беруть участь дефектні профаги, які містяться в хромосомі *E. coli*. Об'єднання таких профагів з новими активними елементами може призвести до активації раніше неактивних геномів та видалення їх з бактеріальної хромосоми. Можливо також, що ДНК-вмісні форми присутні в багатьох, якщо не в усіх популяціях РНК-вмісних вірусів, і що виявлення їх ускладнюється лише відсутністю чітких селективних ознак та відповідного напрямку при вивченні цих вірусів.

*N. Yu. Miryuta, A. Yu. Miryuta, T. P. Pererva*

The physical mapping of the genome of MS2-induced DNA-containing P23-2 phage and detecting of MS2-specific sequences in this genome

Summary

A physical map of the genome of MS2-induced DNA-containing P23-2 phage has been constructed. The order of HindIII, PstI, PvuII, BamHI, EcoRI, SmaI restriction enzymes sites has been determined. The size of the phage DNA is calculated to be about 40 kbp. The MS-2-specific sequences have been detected in this genome.

*N. Ю. Мирюта, А. Ю. Мирюта, Т. П. Перерва*

Физическое картирование генома MS2-производного ДНК-содержащего фага P23-2 и выявление в нем MS2-специфических последовательностей

Резюме

Построена физическая карта одного из представителей группы ДНК-содержащих фагов, выделенных из клеток MS2-индуцированного мутанта *Escherichia coli* 23-2. Локализованы сайты для рестриктаз HindIII, PstI, PvuII, BamHI, EcoRI, SmaI. Определен размер генома фага, составляющий 40 тыс. пар нуклеотидов. Проведен анализ наличия MS2-специфических последовательностей в геноме этого фага с помощью метода гибридизации.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Грен Э. Я. Регуляторные механизмы репликации РНК-содержащих бактериофагов.—Рига: Зинатне, 1974.—232 с.
2. Перерва Т. П., Мирюта Н. Ю., Мирюта А. Ю. Лизогения у фага MS2. Синтез фagospecific РНК на клеточной ДНК // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 1.—С. 45—50.
3. Pererva T., Mirjuta N., Mirjuta A., Wudmaska M., Zherebtsova E. Lyzogeny by MS2-phage. Analysis of a recombinant plasmid containing MS2 RNA-like sequence // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 1.—С. 61—65.
4. Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Алексеенко И. П. Лизогения у фага MS2. Экспрессия MS2-специфической информации сегрегантами нестабильных трансдуцирующих фагов P1 и  $\lambda$  // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 4.—С. 73—83.
5. Pererva T. P. DNA-containing phages neutralizing with anti-MS2 serum // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 6.—С. 459—552.
6. Адамс М. Бактериофаги.—М.: Изд-во иностр. лит., 1961.—527 с.
7. Devos P., Van Emmelo J., Contreras R., Fiers W. Construction and characterization of a plasmid containing a nearly full size DNA-copy of bacteriophage MS2 RNA // J. Mol. Biol.—1979.—128, N 4.—P. 595—619.
8. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—452 p.
9. Fitch W. M., Smith T. F., Ralph W. W. Mapping the order of DNA restriction fragments // Gene.—1983.—22, N 1.—P. 19—29.
10. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated of gel electrophoresis // J. Mol. Biol.—1975.—98, N 3.—P. 503—517.
11. Burrington M. G., Seehater J., Downer D. N., Colter J. S. Rescue of BKV-transformed hamster, rat and mouse cells: correlation with levels of nonintegrated viral DNA // Virology.—1984.—138, N 1.—P. 168—173.
12. Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre, Portela A., Ortin J., Lopez-Galindes C., Perez-Breda P., Villanueva N., Najera R., Van de Pol S., Steinhauer D., De Polo N., Holland J. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance — a review // Gene.—1985.—40.—P. 1—8.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 30.09.98