

ATP-INDEPENDENT DNA TOPOISOMERASE  
FROM THE CHLOROPLASTS OF *NICOTIANA CHINENSIS*

K. G. Karpenchuk

N. G. Kholodny Institute of Botany,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

ATP-independent DNA topoisomerase was extracted from the purified leaf chloroplasts of *Nicotiana chinensis* and partially purified by the salt gradient elution from DEAE-cellulose. Relaxation of negatively supercoiled plasmid *pUR222* by the enzyme was found to be absolutely dependent on the presence of magnesium ions, being completely inhibited by EDTA. DNA topoisomerase activity was tolerant to the spermidine (1.8 µg/ml), novobiocin (80 µg/ml) and ethidium bromide (0.8 µg/ml). Strong magnesium requirement of chloroplast DNA topoisomerase in ATP-independent reaction resembles properties of the prokaryotic counterparts.

1. Gellert M. DNA topoisomerases // Ann. Rev. Biochem. — 1981.—50. — P. 879—910.
2. Siedlecki J., Zimmerman W., Weissbach A. Characterization of a prokaryotic DNA topoisomerase I activity in chloroplast extracts from spinach // Nucl. Acids Res. — 1983.—11, N 5. — P. 1523—1536.
3. Марселус Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. — М.: Мир, 1983.—352 с.
4. *pUR222*, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA / U. Rütther, M. Koenen, K. Otto, B. Müller-Hill // Nucl. Acids Res. — 1981.—9, N 16. — P. 4087—4098.
5. *Endocytobiology* / Eds H. E. A. Schenk, W. Schwemmler. — Berlin; New York: Walter de Gruyter, 1983. — V. 2. — 891 p.
6. Bogorad L. Evolution of organelles and eukaryotic genomes // Science. — 1975.—188, N 4191. — P. 891—898.
7. Srivenogupal K. S., Lockshon D., Morris D. R. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme // Biochemistry. — 1984.—23, N 9. — P. 1899—1906.
8. Kung V. T., Wang J. C. Purification and characterization of an omega protein from *Micrococcus luteus* // J. Biol. Chem. — 1977.—252, N 15. — P. 5398—5402.
9. Kikuchi A., Asai K. Reverse gyrase — a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA // Nature. — 1984.—309, N 5970. — P. 677—681.
10. Brown P. O., Peebles C. L., Cozzarelli N. R. A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979.—76, N 12. — P. 6110—6114.
11. Richardson S. M. H., Higgins C. F., Lilley D. M. J. The genetic control of DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium* // EMBO J. — 1984.—3, N 8. — P. 1745—1752.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 26.11.85

УДК 578.81

МИНИ-ФОРМЫ НИТЕВИДНОГО ВЕКТОРНОГО ФАГА M13

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп

Нитевидный фаг *M13* широко используется в качестве вектора для молекулярного клонирования в *E. coli* [1]. Большая векторная емкость [2] и наличие одноцепочечной (ОЦ) формы, необходимой для секвенирования по методу Сэнгера [3] и сайтспецифического мутагенеза [4], делают фаг *M13* исключительно удобным. Тем не менее, к существенным его недостаткам следует отнести возможную нестабильность рекомбинантов [5] и образование дефектных мини-форм [6, 7]. Необходимость использования фага *M13mp8* [1] в качестве вектора для молекулярного клонирования была причиной предпринятой в данной работе попытки изучения образуемых им мини-форм.

Для выделения мини-фагов клетки из 20 фаговых бляшек вносили в жидкую среду LB [8] и культивировали в течение ночи. Репликативные формы (РФ) фаговой ДНК выделяли по методу [9] и анализировали электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле (рис. 1). Оказалось, что наряду с полными РФ в более чем половине фагосодер-

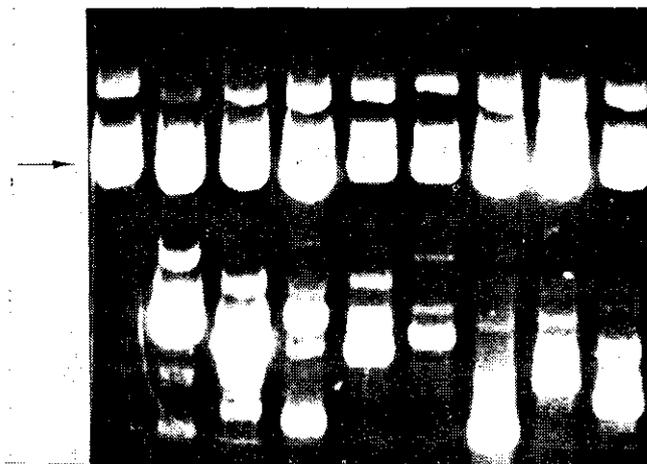


Рис. 1. Электрофорез в 0,8 %-ном агарозном геле РФ фага *M13mp8*. Стрелкой указано положение полной РФ.  
 Fig. 1. An 0.8 % agarose gel electrophoresis of *M13mp8* replicative forms. Arrow indicates position of complete RF.

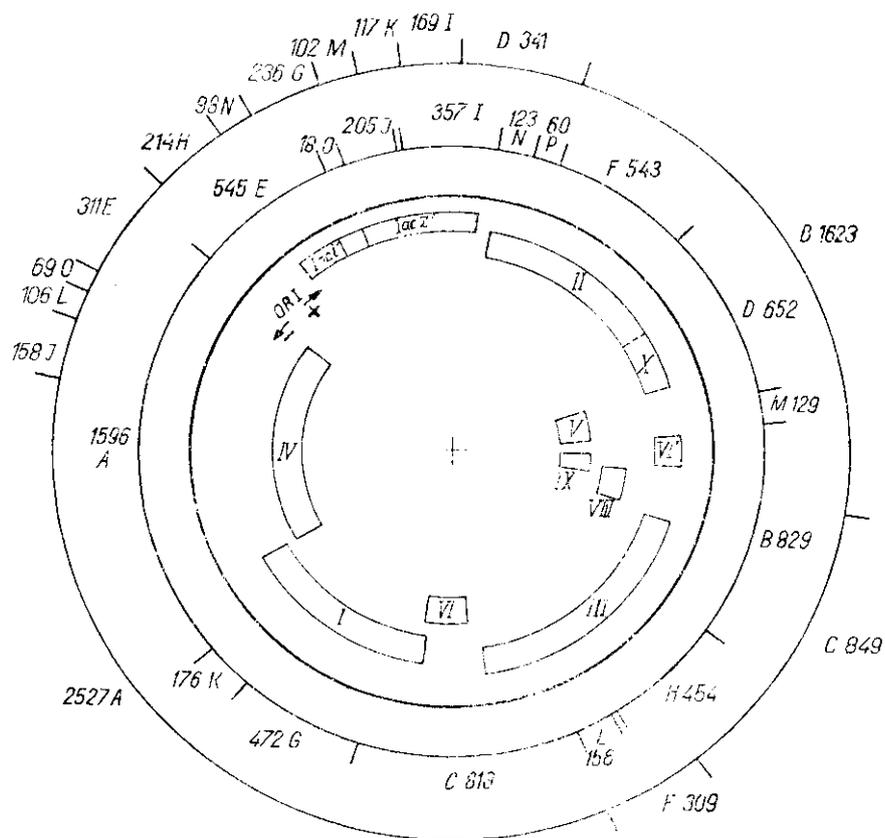


Рис. 2. Схематическое изображение структуры РФ фага *M13mp8*. Фрагменты, образующиеся при расщеплении *BspRI* (внешний круг) и *HpaII* (внутренний круг), обозначены заглавными буквами. Величины фрагментов указаны в п. о. Римскими цифрами обозначены гены.  
 Fig. 2. A schematic drawing of *M13mp8* replicative form structure. Capital letters designate fragments formed by *BspRI* (outer circle) and *HpaII* (inner circle) digestion. Fragments' sizes are given in bp. Roman numerals denote genes.

жащих клонов имеются мини-кольца РФ, причем в клетках, выращенных из одной фаговой бляшки, встречалось иногда по несколько мини-фагов разной величины. Величина мини-РФ составляла от 15 до 50 % полного фагового генома. Для последующего исследования РФ фагов *tr8* и *tr9* выделяли центрифугированием в градиенте плотности CsCl [10], а затем полную и мини-формы разделяли электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле. Полоски агарозы, содержащие соответствующие фаговые ДНК, вырезали.

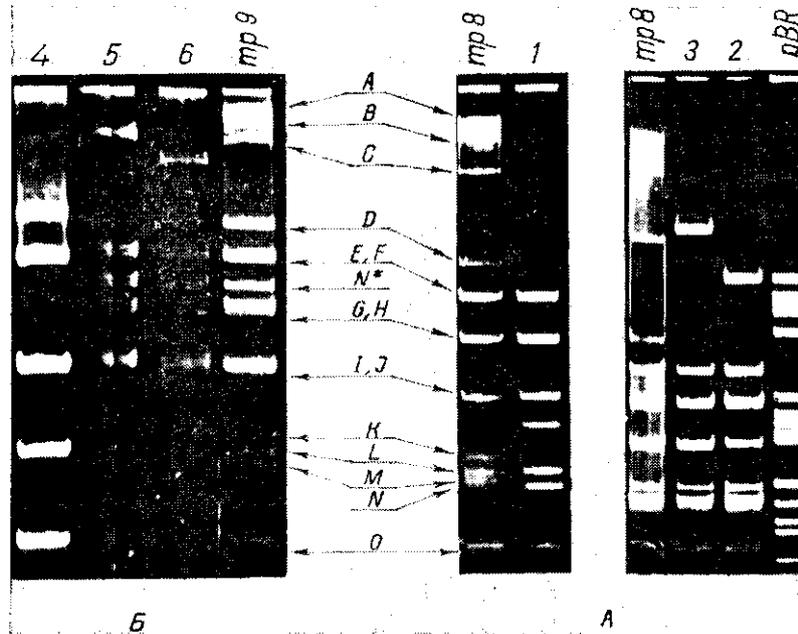


Рис. 3. Электрофорез в 7 %-ном полиакриламидном геле расщепленных *BspRI* полных и мини-РФ *M13tr8* (А) и *tr9* (Б). В качестве реперной использована ДНК *pBR322*, расщепленная *BspRI*.

Fig. 3. A 7% PAAG electrophoresis of *BspRI* cleaved *M13tr8* (A) and *tr9* (B) complete and mini replicative forms. *BspRI* cleaved *pBR322* was used as a marker.

Фаговые ДНК выделяли замораживанием и оттаиванием агарозы [11] с последующей обработкой фенолом, смесью фенол — хлороформ (1 : 1), хлороформом и дважды осаждали спиртом.

В настоящее время известна полная нуклеотидная последовательность фага *M13* [12, 13]. Установлено также [13, 14], что геном фага *M13* дикого типа, состоящий из 6407 пар оснований (п. о.), включает десять генов, образующих три функциональные группы (рис. 2): гены репликации (II, V, X), капсидные (III, VI, VIII, IX) и морфо-

Структура мини-фагов *M13tr8* и *tr9* по данным расщепления *BspRI*  
Structure of *M13tr8* and *tr9* mini phages according to *BspRI* digestion

Мини-фаг	Присутствующие <i>BspRI</i> -фрагменты	Новообразованный <i>BspRI</i> -фрагмент, п. о.	Величина РФ	
			П. о.	% полного генома
<i>tr8</i> 1	J, L, O, E, H, N, G	~ 145	~ 1340	~ 18,5
<i>tr8</i> 2	J, L, O, E, H, N, G, M, K	~ 590	~ 2000	~ 28
<i>tr8</i> 3	J, L, O, E, H, N, G, M, K, I	~ 860	~ 2440	~ 34
<i>tr9</i> 4	J, L, O, E	~ 400	~ 1040	~ 14
<i>tr9</i> 5	J, L, O, E, H, N*	~ 1200	~ 2300	~ 31
<i>tr9</i> 6	J, L, O, E, H, N*	~ 700	~ 1830	~ 24

Примечание. При сравнительном анализе мини-фагов мы учитывали то обстоятельство, что имеющийся в нашем распоряжении фаг *M13tr9* имел увеличенный до 270 п. о. *BspRI*-фрагмент, обозначенный N\*. Поскольку *BspRI*-фрагмент содержит участок гена *lac i*, можно предположить, что причиной такого изменения могла явиться рекомбинация с геном *lac i* клетки-хозяина.

гене́за (I, IV). Исходя из положения гена VII, предполагают [13], что он участвует в репликации или же в формировании вириона.

Для характеристики выделенных нами мини-форм *M13mp8* и *mp9* их подвергли расщеплению эндонуклеазой рестрикции *BspRI*, а в случае необходимости положение отдельных *BspRI*-фрагментов определяли и по картине расщепления мини-форм рестриктазой *HpaII*. С помощью электрофореза в 7 %-ном полиакриламидном геле сравнивали продукты расщепления мини-фагов с продуктами расщепления этими же ферментами полных фаговых РФ. На рис. 3 приведена картина электрофоретического разделения нескольких выделенных мини-фагов, расщепленных *BspRI*. Данные, полученные путем рестриктоного анализа мини-РФ, суммированы в таблице, откуда видно, что наименьший из проанализированных мини-фагов включает ~1040 п. о. и составляет около 14 % полного генома. Ранее было показано [15], что фрагмента РФ *M13* фага, включающего начало участка, кодирующего синтез *ori*-РНК, и сайт одностороннего разрыва, вносимого белком гена II (nicking site of the gene II protein), достаточно при наличии фага-помощника для репликации гибридного генома, составленного из вышеуказанного фрагмента *M13* и фрагмента ДНК *pBR322*. Исходя из этого, способность к репликации у выделенных нами мини-фагов, величина которых соответствует всего лишь 14 % полного генома, можно объяснить наличием в клетках полных фаговых РФ, выполняющих функции фагов-помощников.

#### MINI FORMS OF THE FILAMENTOUS M13 VECTOR PHAGE

*E. B. Paton, A. N. Zhyvoloup*

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

#### Summary

Mini forms of filamentous *M13mp8* and *mp9* phages have been isolated. Sizes of mini phages analyzed varied from 14 to 34 % of the complete phage genome. All mini phages contained an approximately 640 bp DNA fragment including symmetrically located *ori* site.

1. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA — a review // *Gene*.— 1982.—19, N 1.— P. 1—10.
2. Messing J. An integrative strategy of DNA sequencing and experiments beyond // *Recombinant DNA: Proc. III Cleveland symp. on macromolecules* / Ed. A. Walton.— Amsterdam: Elsevier, 1981.— P. 143.
3. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to refine DNA sequencing / R. Sanger, A. R. Coulson, B. G. Barrell et al. // *J. Mol. Biol.*— 1980.—143, N 2.— P. 161—178.
4. Smith M., Gillam S. Constructed mutants using oligodeoxyribonucleotides as site-specific mutagens // *Genetic engineering; Principles and methods* / Eds J. K. Setlow, A. Hollaender.— New York: Plenum press, 1981.— V. 3.— P. 1—32.
5. Barnes W. Construction of an *M13* histidine transducing phage: A single-stranded cloning vector with one *EcoRI* site // *Gene*.— 1979.—5, N 1.— P. 127—129.
6. Корнберг А. Синтез ДНК.— М.: Мир, 1977.— 359 с.
7. Griffith J., Kornberg A. Mini *M13* bacteriophage: circular fragments of *M13* DNA are replicated and packaged during normal infections // *Virology*.— 1974.—59, N 1.— P. 139—152.
8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 395 с.
9. Birnboim H. C., Dolly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*— 1979.—7, N 6.— P. 1513—1523.
10. Messing J. New *M13* vectors for cloning // *Meth. Enzymol.*— 1983.—101.— P. 20.
11. Thuring R. W. J., Sanders J. P. M., Borst P. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels // *Analyt. Biochem.*— 1975.—66, N 1.— P. 213.
12. Van Wezenbeek P. M. G. F., Hulsebos T. J. M., Schoemakers J. G. G. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage *M13* genome: comparison with phage *fd*. // *Gene*.— 1980.—11, N 1.— P. 129—148.
13. Beck E., Zink B. Nucleotide sequence and genome organization of filamentous bacteriophage *f1* and *fd*. // *Ibid.*— 1981.—16, N 1.— P. 35—58.
14. Fulford W., Model P. Gene X of bacteriophage *f1* is required for phage DNA synthesis. Mutagenesis of in-frame overlapping genes // *J. Mol. Biol.*— 1984.—178, N 1.— P. 137—153.
15. Cleary J. M., Ray D. S. Replication of the plasmid *pBR322* under the control of a cloned replication origin from the single-stranded DNA phage *M13* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1980.—77, N 8.— P. 4638—4642.

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

Получено 27.02.86