

박테리오파아지 P4 *ash8 sid71* 입자 내 DNA 형태 분석

송재호 · 김경진*

선문대학교 자연과학대학 생명과학과

바이러스 조립 과정 기작 연구를 위한 좋은 재료인 박테리오파아지 P2-P4 시스템의 packaging 기작 연구를 위해, 머리 크기 조절 유전자 변이체인 P4 *ash8 sid71*의 파아지 입자가 함유하고 있는 DNA의 형태를 분석하였다. 파아지 stock을 준비하고 이것의 CsCl 부양균등밀도 편차실험을 수행하여, 밀도가 다른 두개의 입자들로 분리하였다. 각 입자의 DNA를 분리한 후, 전기영동을 통해 함유된 DNA의 형태를 확인 하였다. 예상과 달리, 각 입자들은 dimer, trimer 뿐 아니라 monomer도 함유하고 있다는 새로운 사실을 발견하였다.

Key words □ bacteriophage P2-P4, *Escherichia coli*, packaging, *sid* gene

*Escherichia coli*에 감염하는 temperate 파아지인 박테리오파아지 P2와 그의 위성파아지인 박테리오파아지 P4는 독특한 생활상(life cycle)을 가지고 있다. 즉 박테리오파아지 P4는 박테리오파아지 P2가 없을 때 전형적인 플라스미드로 존재하지만, 박테리오파아지 P2 존재 하에서는 P2를 도움파아지(helper phage)로 이용하여 lytic 성장을 한다(2, 4). 박테리오파아지 P4는 capsid 생성을 위한 유전자를 갖고 있지 않으며, 도움파아지인 박테리오파아지 P2가 생성하는 머리와 꼬리를 이용하여 파아지로 증식할 수 있다. 그러므로 박테리오파아지 P2와 P4의 머리와 꼬리는 모두 동일한 단백질인 P2의 유전자 생성물(gene products)들로 이루어져 있고, 단지 그 머리 크기에 있어 차이가 난다. 이러한 머리의 크기 차이는 그 안에 packaging될 각 파아지 유전체(genome)의 크기 때문으로 생각된다. P2의 경우 33 kb의 유전체가 들어갈 triangulation number가 7 인 머리가 생성되고, P4의 경우에는 11.6 kb의 유전체가 들어갈 triangulation number가 4 인 머리가 생성된다(5). P4의 머리 부피는 P2 머리 부피의 1/3 정도 되는 것으로 추정된다.

박테리오파아지 P4가 P2를 도움파아지로 하여 증식할 때 나타나는 후손파아지(progeny phage)는 작은 머리를 가진 P4가 대부분이다. Shore 등은 파아지로 증식할 때 항상 P2 크기의 큰 머리를 생성하는 박테리오파아지 P4 변이체를 선별하였다(14). 유전학적인 연구를 통해, 그 변이는 P4가 파아지로 증식할 때 머리 크기를 결정하는 유전자에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이 유전자는 *sid* (size determination)로 명명되었고, Shore 등이 선별한 P4 *sid* 변이체는 항상 큰 머리를 가진 후손파아지를 생성하며 그 머리 속에는 파아지 P4의 유전체가 2개 또는 3개 packaging되어 있는 것이 CsCl 부양 균등밀도 편차실험 (CsCl

buoyant equilibrium density gradient)을 통해 알려졌다. 박테리오파아지 P4의 *sid* 유전자는 P2의 유전자 생성물을 이용하여 원래 P2 머리 부피의 1/3 되는 머리를 조립하게 하는 단백질을 coding한다는 것을 알게 되었다(14). Marvik등은 Sid 단백질이 머리 조립 과정에서 외부지지 단백질(outer scaffolding protein)의 역할을 하여 P4 크기의 머리가 조립되게 한다는 것을 cryo-electron-microscopic image construction을 통해 보여주었다(11).

변이체 P4 *sid*의 큰(P2 크기) 머리 속에 들어있는 P4 DNA는 11.6 kb의 P4 유전체가 dimer 또는 trimer 형태로 packaging되어 있을 것이라 추정되어왔다(2). DNA 복제 과정에서 선형 복합체(linear multimer)를 형성하는 박테리오파아지 lambda와는 달리 plasmid 형태의 bidirectional DNA 복제를 수행하여 covalently closed circle의 monomer를 주로 생성하는 파아지 P4는 dimer 또는 trimer의 숙주세포 내 분포가 낮은 가능성이 있다(8). *In vitro* packaging 실험에서 두 개 또는 세 개의 monomeric P4 유전체가 P2 크기의 머리에 packaging 되는 것이 보고 되었지만(13), 실제 P4 *sid* 변이체의 P2 크기 머리 안에 어떤 형태의 P4 유전체가 들어있는지를 분석한 실험 결과는 발표되지 않았다.

본 연구에서는 P4 *sid* 변이체인 P4 *ash8 sid71* 파아지(12) 머리 안에 들어있는 P4 유전체들의 형태를 알아보기 위해, CsCl 부양 균등밀도 편차실험을 거쳐 얻은 파아지 입자들의 정점(peak)으로부터 DNA를 분리하고 이를 분석하였다. 얻어진 결과는 P4 *sid* 변이체의 P2 크기 머리 안에 monomer 형태의 P4 유전체가 존재한다는 것을 보여주고 있으며, 현재까지 알려진 *cos*-cleavage와 packaging 기작 이외에 새로운 작용 기작이 존재할 가능성을 시사하고 있다.

재료 및 방법

균주, 박테리오파아지

박테리오파아지 P4의 숙주세포로 P2를 prophage로 갖고 있는

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-530-2273, Fax: 041-530-2939
E-mail: kjkim@sunmoon.ac.kr

Escherichia coli C strain인 C295와 C353이 사용되었다(15, 16).

박테리오파이지 P4 *ash8 sid71*은 본 실험실의 stock을 plating 하여 single plaque를 얻은 후 새로운 stock을 준비하여 실험에 사용하였다(12).

박테리오파지 stock 준비

P4 *ash8 sid71* 의 실험실 stock을 *E. coli* C353 lawn에 plating 하여 단일 플라크(single plaque)를 얻었다. 단일 플라크를 숙주 세포 *E. coli* C295 배양액 25 ml 에 옮긴 후 37°C에서 계속 진탕배양하며 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 감소하는 시점에서 최종농도가 0.05 M 되게 EGTA 를 가하여 더 이상 파아지가 숙주세포에 붙지 못하게 하였다. 흡광도의 감소가 멈출 때까지 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거하였다. 파아지가 떠있는 상층액을 취하여 Beckman 사의 Optima LE-80K 초고속 원심분리기로 47,000 g (70Ti rotor 사용), 2 시간 원심 분리하여 파아지 침전물을 얻었다. 이 침전물에 0.075 M MgCl₂를 1 ml 가한 후 4°C에서 2 일정도 방치하여 파아지가 서서히 완충용액에 용해되도록 하였다(1).

CsCl 부양 균등밀도 편차실험(CsCl buoyant equilibrium density gradient)

박테리오파이지 P4 *ash8 sid71* stock의 머리 크기 분포를 알아보기 위한 CsCl 부양 균등밀도 편차실험은 이미 발표된 방법에 의하여 수행하였다(7). 이를 요약하면, 우선 파아지 stock의 일부(0.2 ml 이하)를 평균 밀도가 1.38 g/ml 로 맞추어진 CsCl 용액이 함유된 원심분리 튜브에 가하고 이 튜브를 Beckman Optima LE-80K 초고속 원심분리기를 사용하여 4°C에서 55,000 g (SW 41.1 rotor 사용), 60 시간동안 원심분리 하였다. 원심 분리 후 튜브의 밑에 구멍을 내어 0.4 ml을 한 분획(fraction)으로 하여 모았다. 각 분획의 박테리오파지 역가를 P4 지시숙주세포인 C353을 상대로 plaque assay를 통해 결정하여 분획에 따른 파지 분포도를 구하였다

파아지 DNA 분리

CsCl 부양 균등밀도 편차실험에서 얻은 정점 분획들을 각 각 dialysis 막에 넣고 1,000 배 정도 많은 0.075 M MgCl₂ 완충용액에 대해 4°C에서 교반하며 투석하였다. 3 회에 걸쳐 새로운 0.075 M MgCl₂ 완충용액을 바꿔 주며 투석한 후, 파아지 함유용액을 새로운 tube에 옮겼다.

파아지 DNA를 분리하기 위해, 파아지 함유 용액을 2회에 걸쳐 페놀 추출하고 페놀/클로로포름 혼합액으로 1회 추출하였다. Ethanol 침전법으로 파아지 DNA의 침전물을 얻어 이를 적당량의 멸균 증류수에 녹여, 최종적인 파아지 DNA 용액으로 준비하였다.

파아지 DNA의 분석

각 정점 분획에 함유된 파아지 DNA의 형태를 알기 위해 0.4 % agarose gel에서 전기영동한 후, EtBr 염색을 하여 분석하였다. 파아지 DNA는 *cos*- site의 분리를 위해 75°C에서 10 분간 열처

리 한 후 loading 하였다. 낮은 농도의 gel을 사용하기 때문에 4°C에서 전기영동을 하였다.

전기영동 후 얻어진 agarose gel을 digital camera (Olympus C-3020 model)로 촬영하고, ImageJ software (NIH 제공 freeware; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)를 사용하여 각 band의 density 를 분석하였다. Gel에서 standard로 사용한 lambda *HindIII* marker(Bioneer사, Korea)의 23.1 kb 크기 band를 기준으로 calibration하여 시료 band의 정량화를 시도하였다.

결과 및 고찰

박테리오파이지 P2-P4 시스템에서, 머리 크기를 결정하는 유전자인 *sid* 유전자에 변이가 생긴 박테리오파이지 P4 *ash8 sid71*은 파아지로 증식할 때에 P2 크기의 머리를 생성하므로 두 개 또는 세 개의 유전체를 큰 머리 안에 packaging하는 것으로 알려져 왔다(14). 이 변이체 파아지가 가지고 있는 *ash8* (adapted to a second helper phage P3) 변이는 repressor gene 으로 예상되는 *cI* 유전자에 point mutation이 일어난 것으로, 박테리오파이지 P3 를 도움파아지로 이용하여 plaque를 형성하는 형질을 가진 변이체로 분리되었다. 이러한 *ash8* 변이를 가지는 박테리오파이지 P4는, 도움파아지가 없을 경우 숙주세포 내에서 플라스미드 상태로 안정적으로 유지되는 형질 이외에는 원형(wild type)과 유사하다(9). 이 성질 때문에 보존과 유지가 편리한 박테리오파이지 P4 *ash8*을 원형과 같이 간주하여 많은 실험실에서 사용하고 있다.

박테리오파이지 lambda와 같이 *cos*-cleavage packaging 기작을 가지는 박테리오파이지의 경우, 유전체 DNA 복제 과정에서 선형의 multimer를 형성하고 packaging 과정 중 terminase에 의해 *cos*-site가 절단되어 머리 안으로 들어가게 된다(5). 이 때 dimer 또는 trimer 형태의 DNA가 packaging될 가능성이 존재한다. 그러나 박테리오파이지 P4는 *cos*-cleavage packaging 기작에 의해 packaging되지만, 그 유전체의 복제 과정은 lambda와는 달리 원형의 covalent closed circle DNA가 복제되는 plasmid형 복제기작을 갖는다(6). 그러므로 숙주세포 내에 존재하는 파아지 DNA pool에 multimeric DNA 형태가 우세하지 않게 되고, 존재하는 multimeric DNA는 plasmid형 복제를 거친 DNA들이 resolve되지 않고 남아 있는 것이 될 것이다. P2 크기의 머리 속에 trimer 또는 dimer 형태의 P4 유전체가 packaging되어 존재한다는 것이 현재까지 추정되고 있는 일반적인 견해이다. 비록 숙주세포 내의 파아지 DNA pool에 얼마나 많은 multimeric P4 유전체 DNA가 존재하는지에 대한 연구는 수행되지 않았지만, 본 연구에서는 실제 P4 *ash8 sid71* 파아지 입자에 packaging되어 있는 DNA 형태를 분석하여 이에 대한 해답을 얻고자 한다.

새로이 얻은 P4 *ash8 sid 71* stock 0.2 ml (총 2.0×10^{10} 파아지 입자)을 CsCl 부양 균등밀도 편차실험(CsCl buoyant equilibrium density gradient)을 통해 밀도 차에 의해 분리하여 0.4 ml의 분획을 받은 다음(총 27 분획), 각 분획의 plaque assay를 거쳐 Fig. 1과 같은 분포도를 얻었다. 이미 Shore 등(14)이 발표한 분포도

와 같이 2개의 정점이 나타나는데, 처음 나타나는 정점인 5번째 분획은 P2 크기의 머리에 세 개의 파아지 P4 유전체 DNA가 들어있는 밀도가 높은 입자들이고 끝이 나타나는 정점인 8번째 분획은 P2 크기의 머리에 두 개의 파아지 P4 유전체 DNA가 들어있는 조금 낮은 밀도의 입자들이다. P2 크기 머리에 하나의 monomer 파아지 P4 유전체 DNA가 들어있는 입자들은 전혀 나타나지 않았다.

각 정점에 해당하는 분획(5번, 8번 분획)을 각각 투석하여, 분획에 들어있는 CsCl을 제거하였다. 처리된 분획으로부터 DNA를 분리하여, 파아지 입자내의 DNA 형태를 확인하기 위해 0.4% agarose gel에 전기영동 하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2의 lane 2와 3에서 모두 11.6 kb에 해당하는 monomer 크기의 P4 DNA가 나타났다. 이것은 현재까지 추정된 것과는 달리, P2 크기의 파아지 머리 안에 trimer 또는 dimer 형태의 DNA 이외에 monomer 형태의 DNA가 존재하는 것을 보여주는 결과이다. P4 파아지 입자에는 terminase가 전혀 존재하지 않으므로 파아지 머리로부터 DNA를 분리하는 과정에서 multimer 형태의 DNA가 monomer로 나누어질 가능성은 거의 없다고 생각된다. Lane 3에서 나타나는 위쪽 두개의 band는 trimer와 dimer로 보이며, 반면에 lane 2에서는 위쪽에 dimer로 보이는 한 개의 band만이 나타났다. 이상의 결과로부터, P4 *ash8 sid71*의 밀도가 가장 큰 파아지 입자(분획 5번)들은 P2 크기의 머리에 하나의 trimer, 또는 하나의 dimer와 하나의 monomer, 또는 세 개의 monomer가 packaging된 입자들이 모인 것이며 그들의 DNA 형태는 다르나 입자 안에 packaging 되어있는 전체 DNA 양은 동일하여 같은 밀도를 갖게 된 것이라 설명할 수 있다. 그보다 밀도가 작은 파아지 입자(분획 8번)들은 P2 크기의 머리에 하나의 dimer, 또는 두 개의 monomer가 packaging된 입자들이 모인 것으로 역시 동일한 밀도를 갖게 된 것이라 설명할 수 있다.

Fig. 2에 나타난 band들로부터 영상 분석 소프트웨어를 사용하여 각 P4 유전체 형태 band의 정량화를 수행하였다. Size Marker로 사용한 파아지 lambda의 *HindIII* 절단 시료(Fig. 2의 lane 1) 중 23.1 kb 크기의 band를 기준으로 하여 분획 5번과 8번 DNA 시료에서 나타난 파아지 P4 trimer, dimer, monomer

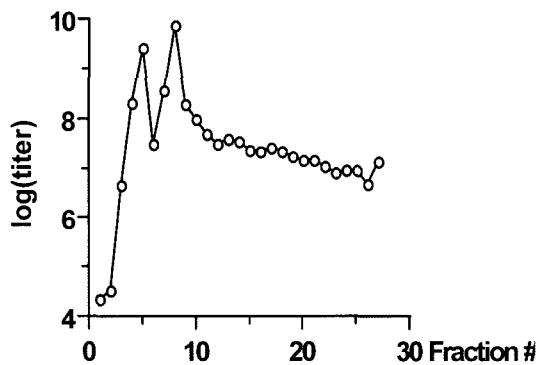


Fig. 1. CsCl buoyant equilibrium density gradient profile of P4 *ash8 sid71*.

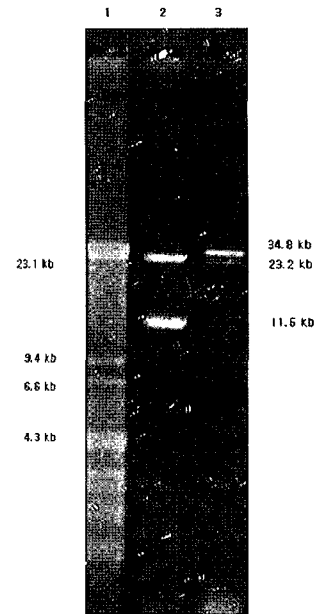


Fig. 2. Identification of the P4 *ash8 sid71* DNA isolated from each peak on 0.4 % agarose gel. Lane 1: lambda *HindIII*-digested fragments (size marker). Lane 2: DNA from the fraction #8. Lane 3: DNA from the fraction #5.

band를 정량 분석하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 분획 5번의 경우, trimer 형태의 DNA가 가장 많이 나타났고, dimer, monomer의 순이었다. 한 개의 dimer와 한 개의 monomer가 P2 크기 머리에 packaging되기 때문에, 0.81 femto moles (1.93 femto moles - 1.12 femto moles)의 monomer만이 남게 되고 이것이 세 개씩 파아지 머리에 들어가므로 이를 감안하면 5번 분획에서 P2 크기 머리에 packaging된 여러 형태의 DNA 조합의 비는 3.39 : 1.93 : 0.27 (trimer : dimer + monomer : 3 monomer)로 계산되었다. 밀도가 가장 큰 P4 *ash8 sid71*의 입자 중 약 61%가 trimer 형태의 P4 유전체로 채워져 있고, 전체의 5% 정도는 세 개의 monomeric P4 유전체가 채워져 있는 것으로 나타났다.

분획 8번의 경우는 두 개의 P4 유전체가 P2 크기 머리에

Table 1. Analysis of each bands with ImajI program

| | Band intensity | Calculated amounts |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|
| Lambda <i>HindIII</i> marker | | |
| 23.1 kb band (control) ^{a)} | 2,038 | 6.35 f moles |
| Fraction #5 | | |
| trimer band (34.8 kb) | 1,637 | 3.39 f moles |
| dimer band (23.2 kb) | 621 | 1.93 f moles |
| monomer band (11.6 kb) | 180 | 1.12 f moles |
| Fraction #8 | | |
| dimer band (23.2 kb) | 1,583 | 4.91 f moles |
| monomer band (11.6 kb) | 2,422 | 15.03 f moles |

a) 200 ng of lambda *HindIII* digested DNA was applied to lane 1 of Fig. 1. According to manufacturer, the amount of 23.1 kb band in this condition was estimated to be equivalent to 95.4 ng.

packaging된 밀도에 해당하는 입자들인데, dimeric P4 유전체나 또는 두 개의 monomeric P4 유전체가 채워질 수 있다. Table 1에 제시한 결과에 따르면 8번 분획에서 P2 크기 머리에 packaging된 DNA 조합의 비는 4.91 : 7.52 (dimer : 2 monomer)로 계산되었다. 밀도가 작은 P4 *ash8 sid71*의 입자 중 40% 만이 dimer 형태의 P4 유전체로 채워져 있는 것으로 나타났다. 분획 5번의 결과와 비교하면, 작은 밀도를 가진 P4 *ash8 sid71* 입자의 경우 monomer로만 채워진 입자의 비중이 높았다. 이는 큰 밀도를 가진 입자는 세 개의 monomeric P4 유전체가 채워질 경우 이론적으로 세 번의 *cos*-cleavage가 일어나야 하지만, 그 보다 작은 밀도를 가진 입자에는 두 번의 *cos*-cleavage만으로 두 개의 monomeric P4 유전체를 채울 수 있으므로 보다 생성될 가능성이 높다는 것으로 설명 가능하다.

본 연구 결과는, 종래의 추정과는 달리 P4 *ash8 sid71*의 파아지 입자가 trimer 또는 dimer 형태의 P4 유전체만을 함유하고 있지 않으며, 두 개 또는 세 개의 monomer 형태 P4 유전체나 하나의 dimer와 하나의 monomer 형태 P4 유전체가 함께 P2 크기 머리에 packaging 되는 것을 보여 주고 있다. Trimer나 dimer의 경우, 두 개 또는 세 개의 *cos*-cleavage site 중 하나만이 packaging 과정에서 절단되어 packaging되는 것으로 알려져 있다(3). 그러나 두 개 또는 세 개의 monomer나 각각 하나의 dimer와 monomer가 함께 P2 크기 머리에 packaging 되는 과정은 현재까지 알려진 *cos*-cleavage와 packaging 기작으로는 이해하기 힘들다. 아마 packaging 과정 중 prohead에 결합되어 있는 terminase 복합체가 한 번의 *cos*-cleavage site 절단 후 떨어지지 않은 채 계속 남아 두 번째 채워질 monomeric 또는 dimeric P4 유전체의 절단을 수행하거나, 또는 terminase 복합체가 prohead로부터 분리된 후 prohead의 밀도가 적정 수준 이하인 것으로 인지되어 파아지 조립 다음 단계로의 진행이 정지되고 다시 terminase 복합체가 결합하여 플라스미드 형태의 P4 유전체를 더 채워 prohead의 적정 밀도를 유지할 것이다. 이러한 추정은 *cos*-cleavage packaging 작용 기작을 따르는 일반적인 파아지와 달리, 파아지 P2-P4 시스템에서는 P2 크기 머리에 적어도 두 개 이상의 monomer 분량의 DNA를 채우려는 일종의 headful packaging 작용 기작이 존재할 것이라는 예측을 하게 한다. 이러한 작용 기작의 존재를 증명하고, 이에 관여하는 요소들을 분리 동정하는 것이 앞으로의 과제일 것이다.

참고문헌

1. 김경진. 1998. 박테리오파이지 P2-P4 시스템을 위한 벡터 플라스미드 개발과 안정성. 미생물학회지 34, 236-242.
2. Bertani, L.E. and E.W. Six. 1988. The P2-like phages and their parasite, P4, vol. 2. pp. 73-143. In R. Calendar (ed.), The Bacteriophages. Plenum Press, New York.
3. Bowden, D.W. and P. Modrich. 1985. *In vitro* maturation of circular bacteriophage P2 DNA. *J. Biol. Chem.* 260, 6999-7007.
4. Briani, F., G. Deho, F. Forti, and D. Ghisotti. 2001. The plasmid status of satellite bacteriophage P4. *Plasmid.* 45, 1-17.
5. Dokland, T., B.H. Lindqvist, and S.D. Fuller. 1992. Image reconstruction from cryo-electron micrographs reveals the morphopoeitic mechanism in the P2-P4 bacteriophage system. *EMBO J.* 11, 839-846.
6. Earnshaw, W.C. and S.R. Casjens. 1980. DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages. *Cell.* 21, 319-331.
7. Kim, K.-J., M.G. Sunshine, B.H. Lindqvist, and E.W. Six. 2001. Capsid size determination in the P2-P4 bacteriophage system: suppression of *sir* mutations in P2's capsid gene *N* by supersid mutations in P4's external scaffold gene *sid*. *Virology.* 283, 49-58.
8. Krevolin, M.D. and R. Calendar. 1985. The replication of bacteriophage P4 DNA *in vitro*. Partial purification of the P4 α gene product. *J. Mol. Biol.* 182, 509-517.
9. Lin, C.S. 1983. genetic and molecular studies of bacteriophage P4: *ash* mutants and DNA sequence between genes *psu* and *alpha*. Ph.D. thesis, University of Iowa, Iowa City, Iowa.
10. Lindqvist, B.H. and E.W. Six. 1971. Replication of bacteriophage P4 DNA in a non-lysogenic host. *Virology.* 43, 1-7.
11. Marvik, O.J., T. Dokland, R. Nokling, E. Jacobson, T. Larsen, and B.H. Lindqvist. 1995. The capsid size-determining protein Sid forms an external scaffold on phage P4 procapsids. *J. Mol. Biol.* 251, 59-75.
12. Nilssen, O., E.W. Six, M.G. Sunshine, and B.H. Lindqvist. 1996. Mutational analysis of the bacteriophage P4 capsid-size-determining gene. *Virology.* 219, 432-442.
13. Pruss, G., R. Goldstein, and R. Calendar. 1974. *In vitro* packaging of satellite phage P4 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 2367-2371.
14. Shore, D., G. Deho, J. Tsipis, and R. Goldstein. 1978. Determination of capsid size by satellite bacteriophage P4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 400-404.
15. Six, E.W., and C.A.C. Klug. 1973. Bacteriophage P4: A satellite virus depending on a helper such as prophage P2. *Virology.* 51, 327-344.
16. Six, E.W., M.G. Sunshine, J. Williams, E. Haggard-Ljungquist, and B.H. Lindqvist. 1991. Morphoietic switch mutations of bacteriophage P2. *Virology.* 182, 34-46.

(Received February 25, 2006/Accepted March 18, 2006)

ABSTRACT: Analysis of DNA Conformation in the Particles of Bacteriophage P4 Mutant, P4 *ash8 sid71*

Jaeho Song and Kyoung-Jin Kim* (Department of Life Science, College of Natural Science, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea)

To study the packaging mechanism of the bacteriophage P2-P4 system which is a useful experimental tool for the study of viral capsid assembly, we analyzed the DNA contents of P4 *sid⁻* mutant, P4 *ash8 sid71*'s phage particles. Two kind of particles having different density were separated by the CsCl buoyant equilibrium density gradient experiment with fresh made stock of P4 *ash8 sid71*. The DNA from each particles was prepared and its conformations was analyzed by electrophoresis. Unexpectedly, both particles contain not only dimeric and trimeric but also monomeric P4 DNA.