

С. М. АКОПЯН, М. Г. ГАЛУСЯН, А. С. АГАБАЛЯН, Э. Г. ЗАХАРЯН,
Л. М. АМИРХАНОВА, Н. Г. АЗАРЯН, Д. Г. АРУТЮНЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГА Pf-16 И ЕГО ДНК

Физическими методами исследования установлено, что фаг Pf-16 относится к III группе, а его ДНК, длиной в 47 мкм, имеет молекулярный вес $94 \cdot 10^6$ дальтон.

В последние годы интерес к бактериям вида *Pseudomonas putida* обусловлен обнаружением у них плазмид биodeградации ароматических соединений (таких как фенол, бензоат, салицилат, камфора, алканы, нафталин) [1—4]. Весьма перспективным в изучении генетики штаммов указанного микроорганизма является использование ДНК-содержащего фага Pf-16, осуществляющего неспецифическую трансдукцию [5]. Поэтому предварительное электронномикроскопическое исследование фага Pf-16 и его ДНК представляло определенный интерес с точки зрения дальнейшего изучения тонкой структуры и состава фатого генома.

Материал и методика. Выращивание, концентрирование и очистка фага. Бактериофаг Pf-16* (лизирующий штамм *Pseudomonas putida* P₉ Cl**) выращивали в агаризованном мясоептонном бульоне в титре $3-5 \cdot 10^{11}$ /мл. Концентрирование и очистку фага производили путем двукратного дифференциального центрифугирования. Окончательную очистку производили с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте хлористого цезия (центрифуга УЦП-60, ротор типа РКС-24,3×56 мл, 24000 об/мин, 4 часа, 10°). Затем фаг диализовался в течение 2 суток на холоду против 0.01 М трис-HCl-буфера (pH 7.5), содержащего 0.2 М NaCl; 0.002 М MgCl₂.

Электронномикроскопическое исследование. Концентрированную и очищенную суспензию фага наносили на сетки, промывали 5—6 каплями 0.1 М аммоний-ацетатного буфера (pH 6.0) и контрастировали 2% водным раствором уранилацетата.

Препараты ДНК фага готовили следующим образом: к реакционной смеси (0.05 М Na₂CO₃; 0.005 М ЭДТА; 1Н NaOH; 10% CH₂O) добавлялся фаг до конечной концентрации 10 γ/мл; сразу же после быстрого встряхивания с помощью шприца системы Hamilton эту смесь в количестве 10 мкл добавляли к 100 мкл охлажденного раствора 0.5 М ацетата аммония (Merck) с 0.02 М ЭДТА и 100 мкл цитохрома C (Serva). К полученному раствору добавляли равный объем охлажденного формамида (Fluka). После 10-минутного выдерживания при комнатной температуре приготовленную таким образом гиперфазу осторожно наносили на поверхность гипофазы, содержащей 0.25 М ацетата аммония. Пленку цитохром-ДНК переносили на медные сетки, покрытые укрепленной углем парлодиевой подложкой. ДНК окрашивали спиртовым раствором уранилацетата (10^{-5} М) и стелили иридием или платиной. Во всех случаях пригос-

* Фаг получен от А. Чакрабартти (США).

** Получен от Шаппро (США) через В. И. Крылова (Москва, ВНИИ генетики).

товления препаратов ДНК в гиперфазу добавляли в качестве репера плазмидную ДНК Col E1* в конечной концентрации 1 μ /мл.

Напыление углем и оттенение металлами проводили на установке Jeol-JEE-3B, снабженной вращающимся столиком. Препараты оттеняли под углом 7—8°. Работа проводилась на электронном микроскопе BS-16 (ЧССР) при ускоряющем напряжении 80 кв.

Определение длины и молекулярного веса ДНК фага Pf-16. С помощью фотоувеличителя «Белорусь» негативы электронных микрофотографий проецировали на бумагу и обрисовывали молекулы; длину ДНК фага Pf-16 и Col E1 измеряли курвиметром. Общее увеличение составляло $\times 1000000$. Определение длины ДНК и ее молекулярного веса проводилось по формулам, приведенным в работе Ланг и др. [6].

Результаты и обсуждение. Данные равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия показали, что «плавучая плотность» целого фага соответствует 1,51; они полностью подтверждают результаты исследований Чакрабартти и Гунзалес [7].

Электронномикроскопическое изучение негативно контрастированных препаратов нативного фага выявило в основном вирусные частицы с головкой гексагональной формы, имеющей длинный отросток, заканчивающийся выраженной базальной пластинкой (рис., а, б, в).

При просмотре большого количества препаратов нам практически не удалось обнаружить фаги с сокращающимся чехлом отростка. Характерной особенностью прикрепления отростка к капсиду фага является наличие хорошо выраженной шейки. Причем у фагов, лишенных ДНК (рис., б, в), в месте прикрепления отростка внутри головки имеется электроннооптически плотная пластинка в виде клапана. Отростки фагов образованы спирально скрученным тяжем. Об этом свидетельствует хорошо выраженная периодическая исчерченность. Базальная пластинка оканчивается округлыми выступами.

В результате статистической обработки произведенных измерений фаговых капсидов были определены максимальный и минимальный диаметры головки исследуемого фага: $D_{\max} = 1065,57 \text{ \AA}$; $D_{\min} = 929,94 \text{ \AA}$.

Анализ микрофотографий нативных фаговых частиц показал, что исследуемый фаг имеет отросток длиной 1365,57 $\text{\AA}$ и шириной 224,94 $\text{\AA}$. Размер базальной мембраны—471,48 $\text{\AA}$.

Параллельно морфологическому изучению фага Pf-16 нами было предпринято электронномикроскопическое исследование его ДНК с целью определения ее длины и молекулярного веса.

На рисунке (в) представлена микрофотография фрагментов ДНК фага Pf-16 и ДНК Col E1, полученных по описанной выше методике. При работе с раствором высокополимерной ДНК фага Pf-16 особое значение придавалось концентрации препарата в цитохромной смеси. Незначительное повышение концентрации ДНК (более 1 μ /мл) приводило к формированию агрегированных молекул, что в значительной степени затрудняло разграничение одной молекулы от другой, а это делало практически невозможным проведение измерений с негативов.

* ДНК Col E1 получена от В. Г. Богуша (Москва, ВНИИ генетики).

Следует также заметить, что большая длина молекул ДНК не позволяла проводить съемку в пределах одной фотопластины. «Идеальное» расположение молекул на пленке-подложке позволяло отснять ДНК на 2—3 фотопластинках.

На рисунке (в) показан случай, где хорошо видны два фрагмента одной нити ДНК фага Pf-16 и кольцевые ДНК Col E1, в виде суперскрученных и открытых молекул.

При анализе микрофотографий нативных молекул ДНК фага Pf-16 в результате проведенных курвиметром измерений было установлено, что средняя длина исследуемой ДНК составляет 470,6 см, а ДНК Col E1—22,4 см. Для вычисления истинной длины ДНК (в мкм) необходимо было определить общее увеличение молекул (n) на микрофотографиях:

$$n = \frac{L_{\text{Col}}^{\text{Col}} \cdot 10^4}{L_{\text{мкм}}^{\text{Col}}}, \quad (1)$$

где $L_{\text{см}}^{\text{Col}} = 22,4$ см, а $L_{\text{мкм}}^{\text{Col}}$ — истинная длина ДНК Col E1—2,2 мкм. Подставив значение $L_{\text{см}}^{\text{Col}}$ и $L_{\text{мкм}}^{\text{Col}}$ в формулу (1), получим значение n , равное $10,4 \cdot 10^4$. Расчет, согласно данным $L_{\text{мкм}}^{\text{ДНК}} = \frac{L_{\text{см}}^{\text{ДНК}}}{n}$ и отношению $\frac{L_{\text{мкм}}^{\text{ДНК}}}{n}$, показал, что длина исследуемой ДНК составляет

47 мкм. Исходя из величины линейной плотности, предложенной Фрейфельдером для различного состава А+Т и Г+Ц пар в молекуле ДНК, был определен молекулярный вес ДНК фага Pf-16. Для ДНК Pf-16 [7] данный коэффициент составляет $2,07 \cdot 10^6$. Отсюда по формуле, предложенной Ланг и др. [6], молекулярный вес ее составляет $94 \cdot 10^6$ дальтон. По данным Холлвея [8], он равен $100 \cdot 10^6$ дальтон. Это небольшое различие можно объяснить используемыми методическими приемами: нами применялась техника электронной микроскопии, а Холлвеем—электрофоретический метод.

Таким образом, проведенные электронномикроскопические исследования позволили установить, что исследуемый фаг относится, по классификации Тихоненко [9], к III группе: длина его ДНК составляет 47 мкм, а молекулярный вес— $94 \cdot 10^6$ дальтон.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 10.VI 1977 г.

Ս. Մ. ՀԱՊՐԱՆ, Մ. Գ. ԳԱՆՈՒՍՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՂԱՐԱՅԱՆ,
Լ. Մ. ԱՄԻՐԵԱՆՈՎԱ, Ն. Դ. ԱԶԱՐՅԱՆ, Դ. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱԲԱՐՅԱՆ

Pf-16 ՖԱԳԻ ԵՎ ՆՐԱ ԴՆԹ-Ի ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿԱՅԻՆ
ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա. մ փ ո փ ո լ մ

Էլեկտրոնամանրագիտակային մեթոդով որոշվել է, որ Pf-16 ֆագը ունի հեքսագոնալ ձևի գլխիկ և երկար ելուստ, որը վերջանում է բնորոշ բազալ թիթեղիկով:

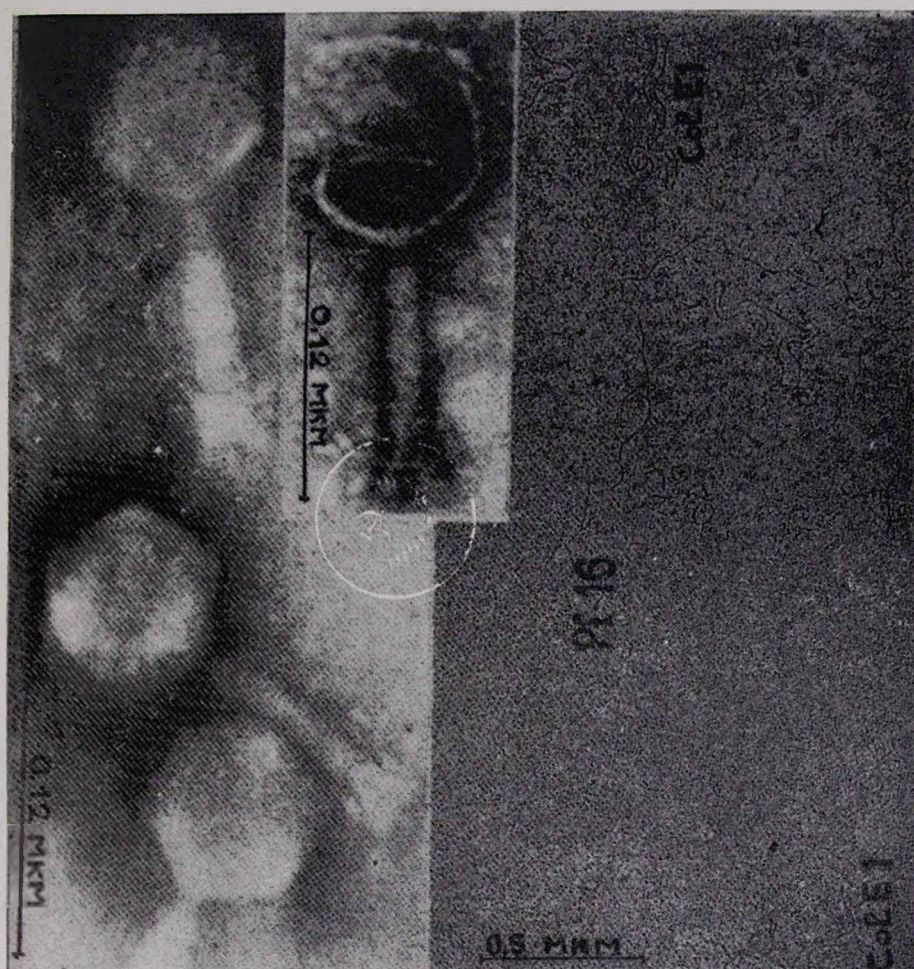


Рис. а, б, в: а—интактные частицы фага Pf-16; б—пустая частица фага Pf-16; в—фрагмент молекулы ДНК фага Pf-16 и Col E1.

Նրա ԴՆԹ-ն ունի 47 միլիմիկրոն երկարություն և $94 \cdot 10^6$ դալտոն մոլեկուլյար կշիռ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Chakrabarty A. M.* J. of Bacteriology, 112, 815, 1972.
2. *Rheinwald J. G., Chakrabarty A. M., Gunsalus Y. C.* Proc. Nat. Acad. Sci USA, 70, 885, 1973.
3. *Chakrabarty A. M., Chou G., Gunsalus Y. C.* Proc. Nat. Acad. Sci USA, 70, 1137, 1973.
4. *Dunn N. W., Gunsalus Y. C.* J. of Bacteriology, 114, 974, 1973.
5. *Gunsalus Y. C., Gunsalus C. F., Chakrabarty A. M., Sikes S., Crawford J. P.* Genetics, 60, 419, 1968.
6. *Lang D. J.* Molecular Biology, 54, 557, 1970.
7. *Chakrabarty A. M., Gunsalus Y. C.* Virology, 38, 92, 1969.
8. *Holloway B. W.* Bacteriological Reviews, 33, 419, 1969.
9. *Тихоненко А. С.* Ультраструктура вирусов бактерий, М., 47, 1968.