

А. С. АГАБАЛЯН, А. А. ЧАРЧОГЛЯН, К. А. БАКУНЦ,
Н. С. ГАСПАРЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

МЕТОД ПРЕПАРАТИВНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЭКСТРАХРОМОСОМАЛЬНОЙ ДНК БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА СЕФАРОЗЕ

Изучалась возможность разделения хромосомальной и экстрахромосомальной ДНК на геле сефарозы. Хроматография тотальной нуклеиновой кислоты, полученной из *Bac. thuringiensis* на сефарозе 4В, позволяет четко фракционировать хромосомальную и экстрахромосомальную ДНК. Более того, экстрахромосомальные ДНК элюируются с колонки частично разделяясь, предшествуя бактериальной ДНК. Использование этого метода дает возможность получать до 500 мкг экстрахромосомальной ДНК. Преимуществами метода являются эффективность и быстрота получения экстрахромосомальной ДНК в достаточных количествах. Другим преимуществом является широкая доступность его.

Методы выделения нуклеиновых кислот, их очистки, фракционирования и препаративного получения в больших количествах до сих пор не потеряли своей актуальности. Фракционирование нуклеиновых кислот проводят рядом способов, основанных на различиях в их константах седиментации, плавучей плотности, молекулярном весе и других физико-химических параметрах [1, 2]. Использовались также ионно-обменная и адсорбционная хроматографии на гидроксилапатите, кизельгуре с метилированным альбумином, полилизин-кизельгуре, протамин-кизельгуре [3—8].

Все указанные способы, большинство из которых связаны с применением дорогостоящего оборудования, были использованы для разделения нуклеиновых кислот различных классов и не были эффективны при попытках получения препаративных количеств экстрахромосомальной плазмидной ДНК.

Целью настоящей работы являлась разработка метода фракционирования нуклеиновых кислот, позволяющего получать достаточные количества экстрахромосомальной плазмидной ДНК бактериального происхождения на сефарозе.

Материал и методика. В работе использовали два штамма *Bac. thuringiensis*: штамм 837, выделенный из инфицированного тутового шелкопряда в 1963 г. в Ереване и образующий энтомоцидные ромбевидные включения; штамм 641, выделенный из подстилки на выкормке гусениц тутового шелкопряда в Ереване в 1959 г., не образующий энтомоцидных кристаллоподобных включений. Оба штамма были любезно предоставлены Институтом микробиологии АН АрмССР.

Выделение ДНК из различных источников. ДНК из разных объектов получали в основном двумя способами. При выделении ее из печени крыс, пекарских дрожжей и лейкоцитарной массы применяли модификацию метода Мармура, предложенную Галояном и др. [2]; из двух штаммов *Bac. thuringiensis* выделяли по методу, описанному Гуерри с сотр. [6] для выделения плазмидных ДНК. Этот метод позволяет получить около 96% плазмидной ДНК с небольшой примесью хромосомной ДНК (около 4%).

Хроматография ДНК на сефарозе 4В. Гель сефарозы отмывали несколько раз 0,1% SDS, а затем дистиллированной водой. Для предохранения от бактериального загрязнения гель сефарозы готовили в буфере НТ (2,5 М NaCl—0,02 М трис, pH 7,5) из расчета 5—10 мл геля на 1 мг нуклеиновой кислоты. Материал (тотальная нуклеиновая кислота), суспендированный в минимальном объеме буфера НТД (0,1 М NaCl, 0,02 М трис, 0,1% SDS), настилали на поверхность геля и элюировали буфером НТД, pH 7,5. Скорость элюции составляла 0,25—0,3 мл/мин.

Электрофорез ДНК в 0,6% агарозном геле. Электрофоретические трубки заполняли расплавленной и охлажденной до 45° агарозой, приготовленной на электродном буфере Е с 0,1% SDS.

На гель настилали до 10 мкг ДНК в 25% сахарозе. Электрофорез проводили при общем напряжении 84 в и силе тока 3,5 мА на трубку. Об окончании электрофореза судили по прохождению бромфенолсинего. Гели окрашивали этидиум бромидом (1 мкг/мл) в течение 30 мин, смывали и анализировали в хемископе.

Качественный и количественный анализ нуклеиновых кислот проводили с использованием дифениламиновой и орциновой пробы [3] и спектрофотометрически при 260 нм из расчета 1 ОД—50 мкг ДНК.

Результаты и обсуждение. *Хроматография экстрахромосомальной ДНК.* ДНК, выделенные из двух штаммов (837 и 641) *Bac. thuringiensis*, осаждали, суспендировали в минимальном объеме НТД и настилали на гель сефарозы 4В. Элюцию препарата проводили тем же буфером. Из представленной хроматограммы (рис. 1), видно, что тотальная нуклеиновая кислота разделяется на колонке с сефарозой с образованием двух четких пиков, из которых первый содержит высокомолекулярную хромосомальную ДНК, а второй, большой пик,—смесь экстрахромосомальной ДНК и бактериальной РНК. Отмечается некоторое несовпадение начала элюции больших пиков при полной корреляции районов элюции с колонки пиков хромосомальной ДНК, из-за присутствия в нуклеиновой кислоте штамма 837 одной добавочной плазмиды с относительно большим молекулярным весом.

Анализ фракций больших пиков по дифениламиновой и орциновой пробе выявил наличие РНК, причем на вершине пика она появляется в смеси с ДНК, нисходящая часть пика представлена в основном РНК. Экстрахромосомальная же ДНК без примесей выявляется в восходящей части пика.

Электрофорез экстрахромосомальной ДНК в 0,6% геле агарозы. С целью подтверждения полученных результатов экстрахромосомальную ДНК и фракции хромосомальной и экстрахромосомальной ДНК, полученные после хроматографии на сефарозе 4В, подвергали электрофорезу в 0,6% агарозе. Как видно из рис. 2, имеет место полная корреляция между разделением хромосомальной и экстрахромосомальной ДНК путем электрофореза в агарозе и хроматографией на сефарозе 4В.

Хроматография ДНК, полученной из различных источников на сефарозе 4В. Из рис. 1 видно, что ДНК из печени крыс и лейкоцитарной массы человека элюируются с колонки одним пиком, совпадающим с пиками хромосомной ДНК на хроматограммах А и Б. Наблюдае-

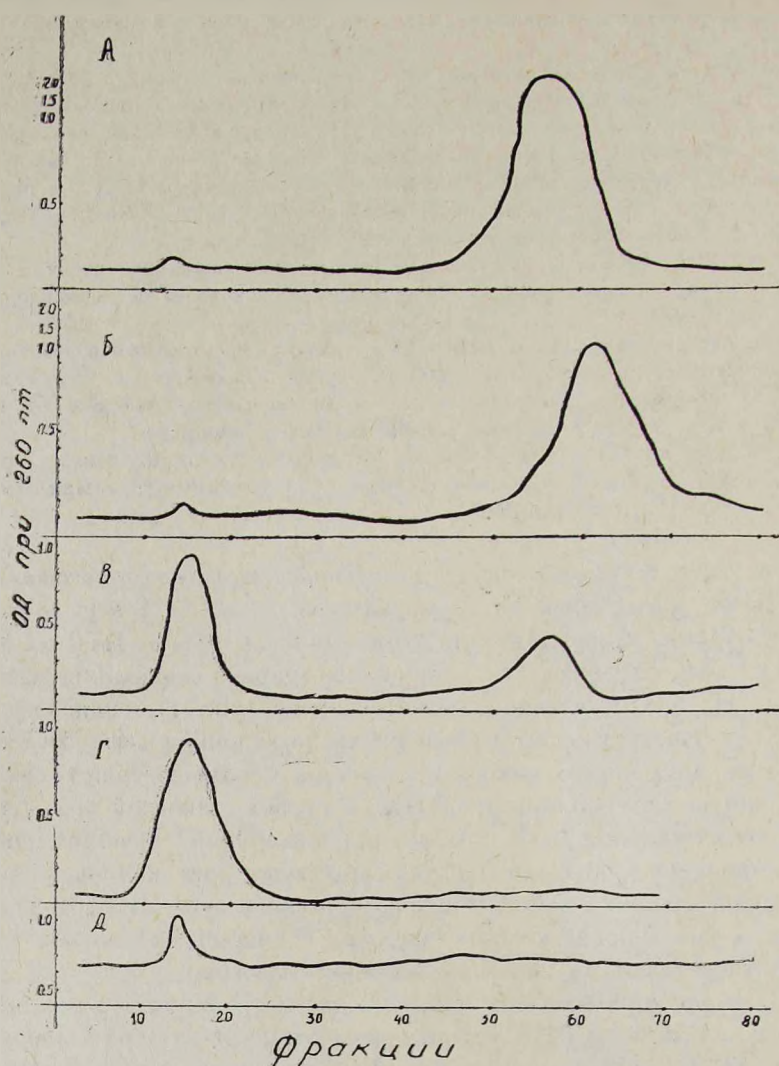


Рис. 1. Хроматограмма ДНК из различных источников на сефарозе 4В. А. ДНК из *Vac. thuringiensis*, шт. 837; Б. ДНК из *Vac. thuringiensis*, шт. 641; В. ДНК из пекарских дрожжей; Г. ДНК из печени крыс. Д. ДНК из лейкоцитарной массы человека.

мый в некоторых случаях небольшой всплеск в области, соответствующей экстрахромосомальной ДНК, можно объяснить, вероятно, примесями РНК. Что же касается ДНК, полученной из дрожжей, то она элюируется с сефарозы 4В двумя пиками, хроматографический профиль которых совпадает с профилем элюции ДНК из *Vac. thuringiensis*. Вто-

рой пик в этом случае обусловлен присутствием дрожжевой митохондриальной ДНК.

По имеющимся в литературе немногочисленным данным, хроматография нуклеиновых кислот на сефарозе 4В позволяет дифференцировать ДНК от разных видов РНК [9]. Однако мы не встречали данных, указывающих на разделение нуклеиновых кислот одного класса. При использовании хроматографии тотальной нуклеиновой кислоты, полу-

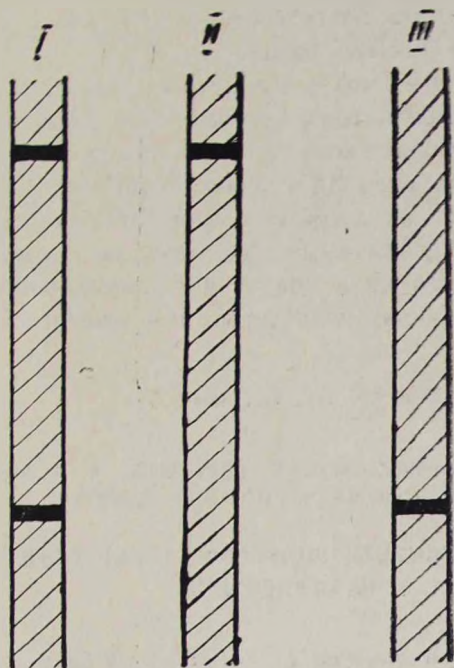


Рис. 2. Электрофорез фракций ДНК *Bac. thuringiensis*, в агарозе. I. ДНК *Bac. thuringiensis*, шт. 641; II. Хромосомальная ДНК после фракционирования на сефарозе; III. Экстрахромосомальная ДНК после фракционирования на сефарозе.

ченной способ, описанным для получения экстрахромосомальной плазмидной ДНК бактериального происхождения, нам удалось получить четкое отделение хромосомальной ДНК от экстрахромосомальной. При гель-фильтрации на сефарозах фракционирование веществ зависит преимущественно от молекулярного веса и в определенной степени от химического строения и формы молекул. Предел эксклюзии сефарозы 4В по молекулярному весу составляет 3×10^5 — 2×10^7 . Возможность фракционирования хромосомальной ДНК *Bac. thuringiensis* на сефарозе 4В обусловлена молекулярным весом хромосомальной ДНК, большей величиной предела эксклюзии, в результате чего в ходе элюции она выходит из колонки первой в пределах свободного объема колонки. Что же касается экстрахромосомальных генов данного штамма *Bac. thuringiensis*, то они и бактериальная РНК имеют молекулярный вес в диапазоне фракционирования сефарозы 4В (3×10^5 — 2×10^7) и

значительно отстают, элюируя через поры геля. Более того, анализ профиля хроматографии нуклеиновой кислоты, полученной из штаммов *Bac. thuringiensis*, 837 и 641, свидетельствует о том, что экстрахромосомальные ДНК (две плазмидные в штамме 837 и одна в штамме 641) элюируют с колонки частично разделяясь, предшествуя бактериальной РНК. Ориентировочный молекулярный вес обнаруженных плазмидных ДНК можно определить в диапазоне эксклюзии сефарозы 4В. Дрожжевая экстрахромосомальная, митохондриальная ДНК имеют молекулярный вес в пределах 2×10^6 — 5×10^6 , что также хорошо коррелирует с профилем хроматографии.

Следует отметить, что используемые в настоящее время методы получения очищенной экстрахромосомальной ДНК не позволяют выделить ее в препаративных количествах. Кроме того, эти методы требуют большой затраты времени и дорогостоящего оборудования.

При применении же хроматографии тотальной нуклеиновой кислоты на сефарозах с различными пределами эксклюзии имеется возможность фракционирования и получения плазмидной и экстрахромосомальной ДНК в больших количествах и в течение относительно короткого времени.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 19.IV 1976 г.

Ա. Ս. ԱԳԱԲԱԼԻԱՆ, Ա. Ա. ՉԱՐՉՈԳԼԻԱՆ, Կ. Ա. ԲԱԿՈՒՆՏ,
Ն. Ս. ԳԱՍՊԱՐԻԱՆ, Բ. Ա. ՋԱԶԱՐԻԱՆ

ԷԽՏՐԱԽՐՈՄՈՍՈՄԱԼ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԴՆԹ-Ի ԲԱԺԱՆՄԱՆ ՄԵԹՈԴ ՍԵՖԱՐՈԶԻ ՎՐԱ

Աշխատանքում անցկացված է քրոմատոմալ և էքստրաքրոմատոմալ ԴՆԹ-ի բաժանման հնարավորությունների հետազոտումը սեֆարոզի վրա: *B. thuringiensis*-ից ստացված տոտալ նուկլեինաթթվի խրոմատոգրաֆիան 4В սեֆարոզի վրա թույլ է տալիս ստանալ քրոմատոմալ և էքստրաքրոմատոմալ ԴՆԹ-ի լավ բաժանում: Ավելին, էքստրաքրոմատոմալ ԴՆԹ-ները (երկու պլազմիդային 837 շտամում և մեկը 641 շտամում) դուրս են գալիս բակտերիալ ԴՆԹ-ից առաջ մասնակի բաժանված վիճակում: Այս մեթոդի կիրառումը հնարավորություն է տալիս ստանալ մինչև 500 մկգ էքստրաքրոմատոմալ ԴՆԹ: Մեթոդի առավելություններն են բավարար քանակությամբ էքստրաքրոմատոմալ ԴՆԹ-ի ստացումը և էֆեկտիվությունը: Մյուս առավելությունն է մեթոդի լալն մատչելիությունը:

A. S. AGABALIAN, A. A. CHARCHOGLIAN, K. A. BAKUNTS,
N. S. GASPARIAN, R. A. ZACKARIAN

A METHOD FOR PREPARATIVE FRACTIONATION OF EXTRACHROMOSOMAL DNA OF BACTERIAL ON SEPHAROSE

It was established that by means of general nucleic acid chromatography with 4В sepharose it is possible to fractionate chromosomal DNA

from extrachromosomal. Using this method it is possible to receive 5700 mkg of extrachromosomal DNA.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабалян А. С., Урысеев Л. В., Еринов Ф. И. *Вопр. вирусол.*, 4, 490, 1972.
2. Галоян А. А., Захарян Р. А., Гарибян Д. В., Галфаян В. Т. *ДАН АрмССР*, 57, 182, 1973.
3. Bernardi G. *Biochem. Biophys. Acta*, 174, 423, 1969.
4. Cannon M., Dunikan L. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 39, 423, 1970.
5. Dische Z. *Mikrochemie*, 8, 4, 1930.
6. Guerri P., LeBlanc D., Falkow S. J. *Bacteriol.*, 116, 1064, 1973.
7. Legault J., Rebeyrotte N., Lepicur A. J. Roussaux *Biochem. Biophys. Acta*, 87, 165, 1964.
8. Mandel J., Hershey A. *Annal. Biochem.*, 1, 66, 1960.
9. Petrovic S., Petrovic J., Morkovic R., Knezevic Z. *Preparative Biochemistry*, 4, 509, 1974.