

КРИПТИЧЕСКИЕ ПЛАЗМИДЫ PSEUDOMONAS PUTIDA G7

Р. А. ЗАХАРЯН, А. С. АГАБАЛЯН, С. М. АКОПЯН,
 Н. С. ГАСПАРЯН, Ш. М. КОЧАРЯН

При помощи метода афинной хроматографии были выделены и электронномикроскопически охарактеризованы плазмидные ДНК из *Pseudomonas putida G7*, функции которых неизвестны. Молекулярный вес этих циркулярных, экстрахромосомальных ДНК варьировал в пределах 3×10^6 — 12×10^6 дальтон. Показано, что обнаруженные молекулы ДНК имеют околохромосомальную локализацию, представляя собой неинтегрированные плазмид—хромосомные комплексы.

Класс циркулярных ДНК, функции которых не установлены (криптические), с молекулярным весом от 1,5 до 65×10^6 дальтон (Д), описан у ряда микроорганизмов. Такие плазмиды цитоплазматической локализации, преимущественно с малым молекулярным весом, обнаружены у *E. coli 15*, в количестве 15 копий на хромосому, с молекулярным весом $1,5 \times 10^6$ Д [1]. У *Ps. aeruginosa*, несущей плазмиду R 931 группы P2, выявлена минициркулярная плаزمида, 1×10^6 Д, причем ее ДНК не гомологична ДНК R 931 [2]. У штамма *Ps. aeruginosa* PAO обнаружены криптические плазмидные ДНК по крайней мере трех типов, с молекулярными весами 1,7, 5,8 и 9,5 мегадальтон [3]. Несколько типов криптических плазмид описано также у *Ps. putida G7* [4].

Хотя физиологическая роль этих плазмид неизвестна, они, вероятно, играют определенную роль при рекомбинировании с другими генетическими элементами клетки.

В настоящем сообщении описываются криптические ковалентно-замкнутые, циркулярные молекулы ДНК с околохромосомальной локализацией у *Ps. putida G7*.

Материал и методика. Бактерии выращивали в мяселептонном бульоне в течение 9—12 час. с аэрацией. В качестве минимальной среды для культивирования бактерий использовали среду Адамса следующего состава: NH_4Cl —1,0, KH_2PO_4 —1,5, Na_2HPO_4 —3,5, MgSO_4 —С,1 на 1 литр воды (количество указано в граммах).

Осветленный лизат получали по методу Клевелла и Хелинского [5]. С этой целью бактериальную массу лизировали при помощи лизоцима (1 мг/мл) и ЭДТА (0,2 М), окончательный лизис достигался добавлением к полученной смеси детергентного коктейля (Бридж-58—1%, ДОХ—0,4%, ЭДТА—0,0625 М). Смесь инкубировали в течение 10 мин при 0°, центрифугировали при 49000 g 30 мин, осадок, содержащий около 96% хромосомной ДНК, собирали и депротенизировали смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24:1). Полученные препараты пукленовых кислот обрабатывали проназой (50 мкг/мл) и РНК-азой (50 мкг/мл) в течение 1 часа при 37°. (Проназу пред-

варительно инкубировали при 37° в течение 2 час., а РНК-азу при 90° в течение 10 мин). Полученные таким путем препараты ДНК денатурировали прогреванием при 81° в течение 10 мин и быстро ренатурировали охлаждением в ледяной бане. ДНК осаждали свежеперегнанным этанолом и хранили при -20° до использования.

Колонку с ДНК-карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ-ДНК) готовили по прописи Потузака и Винтерсбергера [6]. КМЦ (1 г) суспендировали в 50 мл 0,5 Н NaOH. После удаления надосадочной жидкости осадок промывали дистиллированной водой до pH 8,0, суспендировали в 100 мл дистиллированной воды и pH доводили до 3,5 добавлением 0,01 Н HCl. После фильтрации КМЦ трижды отмывали 5 мл смеси этанола с эфиром (1:1), затем 20 мл эфира и высушивали в течение 60 мин при 40°. 20 мг хромосомной ДНК, полученной и обработанной описанным способом, растворяли в 10 мл дистиллированной воды и добавляли к высушенной КМЦ. Полученную в виде суспензии смесь высушивали в течение 60 час. при 40°. Приготовленную подобным образом КМЦ-ДНК суспендировали в 50 мл 0,05 М фосфатного буфера Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 (pH 7,0), содержащего 50% глицерина, и хранили при комнатной температуре 24 час. Суспензию КМЦ-ДНК переносили в колонку (1,6×40 см) и обрабатывали 50%-ным раствором формамида в TES-буфере (0,05 М трис, 0,1 М NaCl, 0,005 М ЭДТА). Колонку промывали дистиллированной водой и уравновешивали TES-буфером.

Препараты для электронномикроскопического анализа готовили по технике Кляйншмидта [7]. Молекулярный вес плазмидных ДНК определяли по Лангу [8], сравнивая с реперной ДНК Col E1.

Результаты и обсуждение. Хроматография денатурированной тотальной ДНК *Ps. putida* G7 на колонке с КМЦ-ДНК. КМЦ-ДНК была использована для фракционирования нативных циркулярных молекул плазмидных ДНК от денатурированной линейной хромосомной ДНК. Препарат ДНК, денатурированной прогреванием, в количестве 7—8 мг сорбировали на колонке с КМЦ-ДНК, затем элюировали TES-буфером (pH 7,2). Как видно из рис. 1, при фракционировании то-

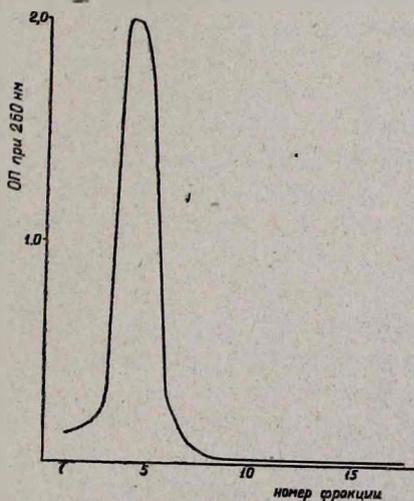


Рис. 1. Фракционирование плазмидных ДНК на колонке с КМЦ-ДНК.

тальной ДНК на колонке с КМЦ-ДНК во всех случаях получали один четкий гомогенный пик, выходивший в первых фракциях эфлюента.

Электронномикроскопическая характеристика фракций этого пика выявила нативные циркулярные молекулы ДНК с различными молекулярными весами, от 3×10^6 до 12×10^6 Д. Все обнаруженные молекулы ДНК имели форму открытых циркулярных молекул (рис. 2).

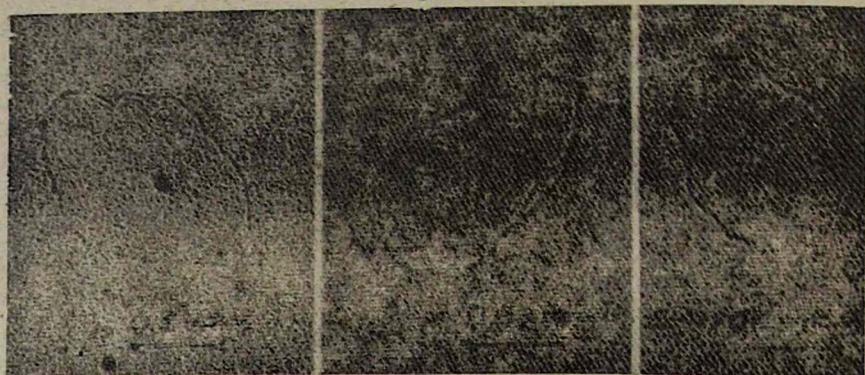


Рис. 2. Электронные микрофотографии криптических плазмидных ДНК *Ps. putida* G7.

Сорбированные на колонке денатурированные молекулы хромосомной ДНК вымывались при промывке КМЦ-ДНК 8М раствором мочевины. Количественный анализ показал, что колонка с КМЦ-ДНК, приготовленная как указано выше, сорбирует на себе около 5—5,5 мг денатурированных молекул ДНК.

Ранее нами было описано несколько типов плазмидных ДНК цитоплазматической локализации у *Ps. putida* G7 [4] с относительно большим молекулярным весом, 30×10^6 Д и выше, которые, возможно, осуществляют биodeградацию нафталина. Однако трансформация способности к биodeградации с помощью соответствующих плазмид до сих пор в литературе не описана [9—11].

Вплоть до последнего времени в литературе появлялись сведения о цитоплазматической локализации экстрахромосомальных плазмидных ДНК, за исключением эписом. Однако при изучении ряда бактериальных препаратов, где присутствие плазмид было доказано генетическими приемами, не удавалось выделить плазмидные ДНК из цитоплазматической фракции. В отношении некоторых из них недавно была показана исключительная или преимущественно околохромосомальная локализация, в виде неинтегрированных плазмид—хромосомных комплексов, в которых хромосомные и плазмидные ДНК связаны между собой посредством РНК [12]. Такие комплексы показаны у *Sal. typhimurium*, *Gon. Neiserril* [13—15] и у *Ps. putida* для *Sal* плазмиды [11].

Сказанное выше свидетельствует о том, что плазмиды, находящиеся под строгим контролем репликации, имеют преимущественную околохромосомальную локализацию, в то время как находящиеся под ос-

лабленным контролем локализованы в основном в цитоплазме. Полученные результаты указывают также на то, что описанные ранее плазмидные ДНК у *Ps. putida* G7 кроме цитоплазматической локализации имеют также околохромосомальную, присутствуя в виде неинтегрированных плазмид—хромосомных комплексов.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 10.III 1978 г.

PSEUDOMONAS G7 PUTIDA ԿՐԻՊՏԻԿ ՊԼԱԶՄԻԴՆԵՐԸ

Բ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՂԱԲԱԼԻԱՆ, Ս. Մ. ԱԿՈՊԻԱՆ,
Ն. Ս. ԳԱՍՊԱՐԻԱՆ, Շ. Մ. ԲՈՉԱՐԻԱՆ

Աֆինային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդի օգնությամբ անջատված և էլեկտրամանրադիտակային հետազոտությամբ բնութագրված են պլազմիդային ԴՆԹ-ներ *Pseudomonas putida*-ից, անհայտ ֆունկցիաներով: Այդ շրջանաձև, արտաքրոմոսոմալ ԴՆԹ-ների մոլեկուլային կշիռը որոշված է 3×10^6 — 12×10^6 դալտոնի սահմաններում: Յույց է տրված, որ հայտնաբերված ԴՆԹ-ների մոլեկուլները ունեն շուրջքրոմոսոմային տեղայնացում՝ չինտեգրացված պլազմիդ-քրոմոսոմային կոմպլեքսների ձևով:

CRYPTIC PLASMIDS OF PSEUDOMONAS PUTIDA G7

R. A. ZAKHARIAN, A. S. AGABALIAN, S. M. AKOPIAN,
N. S. GASPARIAN, Sh. M. KOCHARIAN

The DNA plasmids of unknown function (cryptic plasmids) of *Pseudomonas putida* strain PpG7 have been isolated. Using method of chromatography affinity, the chromosomal location of cryptic plasmids has been established, molecular weights of plasmids being 3 — 12×10^6 daltons.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Janz H., Zandberg J., van de Pol J., Van Brüggem E. Eur. J. Biochem., 9, 156, 1969.
2. Shahrabadi M., Bryan L., van Den Elzen H. J. Gen. Microbiol., 21, 592, 1975.
3. Pemberton J., Clark A. J. Bacteriol., 114, 424, 1973.
4. Захарян Р. А., Агабалиян А. С., Акопян С. М., Кочарян Ш. М., Богочин А. М. ДАН СССР, 232, 482, 1977.
5. Clewell D., Hellinski D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 1159, 1969.
6. Potuzak H., Wintersberger U. FEBS Letters, 63, 167, 1976.
7. Kleinschmidt A. Methods in Enzymology, 12, 361, 1968.
8. Lang D. J. Mol. Biol., 54, 557, 1970.
9. Felst C., Hegeman G. J. Bacteriol., 100, 869, 1969.
10. Reinwald J., Chakrabarty A., Gunsalus I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 885, 1973.
11. Palchaudhuri S., Chakrabarty A. J. Bacteriol., 126, 470, 1976.
12. Miller J., Kline B. Abstrs. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. Atlantic City, N. J. 102, 1976.
13. Sheehy R., Allison D., Curtiss R. J. Bacteriol., 114, 439, 1973.
14. Biswas G., Comer S., Sparling P. J. Bacteriol., 125, 1207, 1976.
15. Wlodarczyk M., Kline B. Biochem. Biophys. Res. Comm., 73, 286, 1976.