

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДНК ФАГА  $\phi r8$   
SALMONELLA DERBYА. С. САФАРЯН, Э. Г. ЗАХАРЯН, К. С. КАРАГЕЗЯН, Н. Н. САРКИСЯН,  
Ж. А. КЦОЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Родственные фаги группы  $\phi r$  1—8 выделены из природных лизотенных штаммов *Salmonella derby* [1], относящихся к одному из наименее распространенных серотипов в ряду *Salmonella*. Как выяснилось, некоторые из фагов  $\phi r$  1—8 осуществляют генерализованную трансдукцию с довольно высокой частотой, кроме того, они способны к фаговой конверсии и осуществляют конверсию морфологии бактерий, антигенных признаков и фаговых рецепторов [2, 3]. Определенный интерес представляет изучение общности и различий в структурных закономерностях ДНК этих родственных фагов, в частности идентификации гомологичных фрагментов, локализации их в геноме репликаона и транскрипционной карты.

В данном исследовании приведены результаты структурного анализа ДНК фага  $\phi r8$  с помощью эндонуклеазы *EcoRI*.

*Материал и методика.* Использован фаг  $\phi r8$ , выделенный из индикаторного штамма K89 *derby*, выращенного на мясоептонном бульоне или агаризованной среде, приготовленной на его основе. ДНК фагов  $\lambda b^2$  и  $\phi r8$  из фаголизатов получали по методу, описанному ранее [4]. Выделение эндонуклеазы *EcoRI* проводилось по методу Грина и др. [5]. Штамм *E. coli* RY13 выращивали в среде, содержащей на литр 10 г бикотриптона, 5—дрожжевого экстракта, 10—NaCl, 5—глюкозы, 5 мМ фосфата натрия (рН 7,0), при 37°, до ранней стационарной фазы. Бактериальные клетки осаждали на рефрижераторной центрифуге при 4° (10000 г, 15 мин).

Клеточный осадок ресуспендировали в экстрагирующем буфере А (10 мМ  $KH_2PO_4$ — $K_2HPO_4$ , рН 7,0; 7 мМ 2-меркаптоэтанола и 1 мМ ЭДТА) и разрушали ультразвуком. Полученную суспензию центрифугировали при 100000 г в течение 1 час. и осадок удаляли. Нуклеиновые кислоты удаляли медленным добавлением 1 мл 10%-го раствора сульфата стрептомицина на каждые 1500  $OD_{260}$  единиц супернатанта. После перемешивания на магнитной мешалке преципитат удаляли центрифугированием (10000 г, 30 мин) и к супернатанту медленно добавляли сульфат аммония до 50%-го насыщения. 50%-ую фракцию, содержащую *EcoRI*, получали центрифугированием (10000 г 30 мин), супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в экстрагирующем буфере А+0,2 М NaCl и диализовали всю ночь против этого же буфера. Раствор наносили на колонку (3×15 см) с фосфоцеллюлозой (P-11, Whatman) со скоростью 40 мл/час, уравновешенную этим же буфером. После посадки колонка промывалась буфером А+0,2 М NaCl. Элюцию проводили в линейном градиенте NaCl (0,2—0,8 М) в экстрагирующем буфере.

Фосфоцеллюлозную фракцию, содержащую *EcoRI* эндонуклеазу (она выходит при 0,5 М NaCl), хроматографировали на колонке (2×20 см) с СМ-целлюлозой

(Whatman, CM-52), уравновешенной буфером Б (0,01 М  $KPO_4$ , pH 7,0, 1 мМ ЭДТА; 0,2% NP 40, 7 мМ 2-меркаптоэтанола) + 0,05 М NaCl.

Фосфоцеллюлозную фракцию заранее диализовали против этого же буфера и наносили на колонку. После посадки колонку промывали буфером Б + 0,05 М NaCl и проводили хроматографию в линейном градиенте 0,5—0,2 М NaCl в буфере Б. Далее проводили гельфильтрацию эндонуклеазного пула с CM-целлюлозы на колонке (5X 95 см) Sephadex G-100, уравновешенной буфером Б + 0,2 М NaCl.

Эндонуклеазная активность элюируется одним пиком на G-100. После гельфильтрации EcoRI гомогенен, что анализируется электрофорезом в ПААГ. Фракции EcoRI после G-100 концентрировали на ГАПСе и хранили при 4° в буфере Б.

Мы использовали 5 мкл фермента в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ  $MgCl_2$ , 0,05 М NaCl и 1—2  $\mu$  ДНК. Инкубацию проводили при 37° в течение 1 часа. Электрофорез—по методу Шарпа и соавт. [6]. Фрагменты, образующиеся при рестрикции, выявили в геле в присутствии бромид аэтидия при облучении ультрафиолетом в диапазоне 270—320 нм.

**Результаты и обсуждение.** ДНК фага  $\phi r8$  расщепляется эндонуклеазой EcoRI на пять фрагментов, сепарируемых гелевым электрофорезом в 0,6%-ом агарозном геле (рис.).

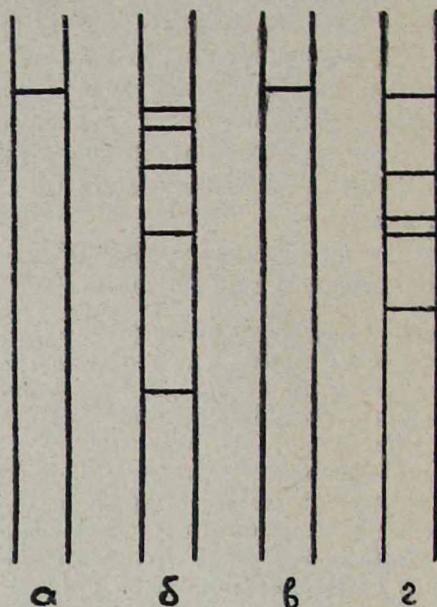


Рис. Электрофоретическое фракционирование в 0,6%-ом агарозном геле фрагментов ДНК фага  $\phi r8$  и  $\lambda$ , рестрицированных эндонуклеазой EcoRI: а—ДНК  $\phi r8$ ; б—ДНК  $\phi r8$  + EcoRI; в—ДНК $\lambda$ ; г—ДНК $\lambda$  + EcoRI.

Рестрикция ДНК  $\phi r8$  EcoRI свидетельствует о наличии в структуре его четырех сайт-специфичных нуклеотидных последовательностей—

5' Г А А Т Т Ц 3'

3' Ц Т Т А А Г 5'

с осью симметрии второго порядка, рекогниция и рестрикция которых эндонуклеазой EcoRI в линейной двуспиральной структуре  $\phi r8$  образует фрагмент с когезивными концами:

. . . . . Г → ААТЦ . . . . .

. . . . . ЦТГАА ← Г . . . . .

Таких последовательностей в структуре ДНК λb<sup>2</sup> также четыре. Относительная подвижность фрагментов ДНК dp8, генерируемых EcoR1, к подвижности фрагментов ДНК λ. позволяет оценить молекулярный вес в 11,0; 7,5; 4,0; 2,7; 0,8 · 10<sup>6</sup> дальтон.

Т а б л и ц а

Величина молекулярных весов (× 10 <sup>6</sup> дальтон)		
ДНК λb <sup>2</sup>	ДНК dp 8	Фрагменты в геле от старта
13,50	11,0	А
4,67	7,5	Б
3,70	4,0	С
2,76	2,7	Д
2,06	0,8	Е
<u>26,69</u>	<u>26,0</u>	

Молекулярный вес линейной структуры ДНК dp8 составляет около 26,0 · 10<sup>6</sup> дальтон (табл.).

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 26.V 1978 г.

### S. DERBY-ի dp-8 ՖԱԳԻ ԴՆԹ-Ի ԲԵՍՏՐԻԿՑԻՈՆ ԱՆԱԼԻԶԸ

Ա. Ս. ՍԱՅԱՐՅԱՆ, Է. Գ. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Վ. Ս. ՂԱՐԱԿՑՈՂՅԱՆ,  
Ե. Ե. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Ժ. Ա. ԿՅՈՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Ե. coR I էնդոնուկլիազայի միջոցով կատարված է dp-8 ֆագի ԴՆԹ-ի ֆրագմենտացիան: էլեկտրաֆորեզի միջոցով որոշված է ստացված ֆրագմենտների մոլեկուլյար կշիռը 2,6 · 10<sup>6</sup> դալտոն:

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вартамян М. К., Карабеков Б. П. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 97, Ереван, 1970.
2. Вартамян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биологический журнал Армении, 30, 9, 14, 1977.
3. Вартамян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биологический журнал Армении, 31, 1, 8, 1978.
4. Захарян Э. Г., Чарчоглян А. А., Карагезян К. С., Африкян Э. Г. Биологический журнал Армении, 31, 1, 3, 1978.
5. Green P., Bettlach M., Boyer H. Methods in Mol. Biologi, 7, 88, 1974.
6. Sharp Ph. A., Sugden B., Sambrook J. Biochemistry, 12, 16, 3055, 1973.