

ТРАНСФЕКЦИЯ ДНК ФАГА  $\phi$ 8 В *SALMONELLA DERBY*  
 И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МУТАНТАХ

Ж. А. КЦОЯՆ, Н. Н. САРКИՅԱՆ

Определена биологическая активность изолированной ДНК фага  $\phi$ 8 и изучена эффективность трансфекции ДНК на радиочувствительных мутантах.

Фаг  $\phi$ 8, выделенный из лизогенной культуры *S. derby* и являющийся представителем умеренных фагов этого штамма [1, 2, 7], оказался весьма интересным объектом для генетических исследований [3, 4].

Цель настоящей работы заключалась в выделении инфекционной ДНК из фага  $\phi$ 8, определении ее биологической активности и изучении эффективности трансфекции фаговой ДНК на радиочувствительных мутантах.

*Материал и методика.* В работе использован фаг  $\phi$ 8, выделенный из природных лизогенных штаммов. В качестве реципиента для изолированной ДНК этого фага служил природный штамм *S. derby* К 89. Генетически чистые линии фагов в высоком титре получены по Адамсу [1].

Концентрированный препарат фага, полученный центрифугированием бульонных фаголизатов, содержал  $1.6 \cdot 10^{11}$  фаговых частиц в 1 мл. Очистку и концентрирование фага проводили полиэтиленгликолем (мол. вес 6000) [18]. Очищенная фаговая суспензия содержала  $4.4 \cdot 10^{12}$  фаговых частиц в 1 мл.

ДНК из фаговой суспензии выделяли методом фенольной депротеинизации [14]. К ней добавляли равный объем фенола, насыщенного 0.1 М трис-НСІ буфером и 0.25%-ным SDS (додецилсульфат натрия). Эту смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Водную фазу, содержащую ДНК, отделяли центрифугированием и процедуру экстрагирования повторяли. ДНК осаждали двойным объемом холодного спирта и хранили при 4° в спирте. Препарат ДНК, чистоту которого определяли спектрофотометрически, сохранял биологическую активность в течение шести месяцев. Отношение оптических плотностей при  $\lambda = 230, 260$  и 280 составляло:

$$\frac{O_{266}}{O_{280}} = 1,92; \quad \frac{O_{266}}{O_{230}} = 2,28.$$

Препарат содержал 500 мкг/мл ДНК и не содержал цельных фаговых частиц, что определялось методом титрования ДНК на чувствительной к фагу культуре *S. derby*.

Опыт по трансфекции проводили компетентными клетками *S. derby* по модифицированной методике Камерона [12]. Компетентность бактериальных клеток достигалась путем кальцинирования 0,05 М раствором  $\text{CaCl}_2$ .

Для определения инфекционности препарата ДНК фага  $\phi$ 8 в 0,2 мл клеточной суспензии вносили препарат ДНК, по 0,1 мл (3 мкг/мл), и инкубировали при 37° в течение 40 мин. Соответствующие разведения инфицированных клеток высевали двуслойным методом [1] на индикаторной газонной культуре *S. derby* К 89.

*Результаты и обсуждение.* Известно, что при постановке опытов по трансфекции методом Манделя и Хига необходимо учитывать два фактора—ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и низкую температуру [17]—от которых зависит формирование у клеток восприимчивости к ДНК.

В наших экспериментах использован 0,05 М  $\text{CaCl}_2$ , на основании данных Манделя и Хига о том, что максимальные показатели трансфекции ДНК фага  $\lambda$  получены при концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  0,02—0,05 М. Концентрирование реципиентных клеток и инкубация в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  проводились на холоду ( $4^\circ$ ).

Для получения высоких показателей трансфекции экспериментально были выбраны оптимальные условия проведения опытов: концентрации клеток, из которых приготовлены сферопласты; концентрация ДНК и продолжительность инкубации клеток, обработанных ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и ДНК при температуре  $37^\circ$ .

Известно, что эффективность трансфекции обработанных ионами  $\text{Ca}^{2+}$  клеток *E. coli* ДНК фага  $\lambda$  зависит от возраста бактериальной культуры [10]. В наших экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста, после которой культура, хранившаяся в течение двух суток как в присутствии, так и в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , теряла компетентные свойства и способность к трансфекции. Концентрация бактерий оказывала существенное влияние на эффективность трансфекции. Как видно из рис. 1, при постоянной концентрации ДНК

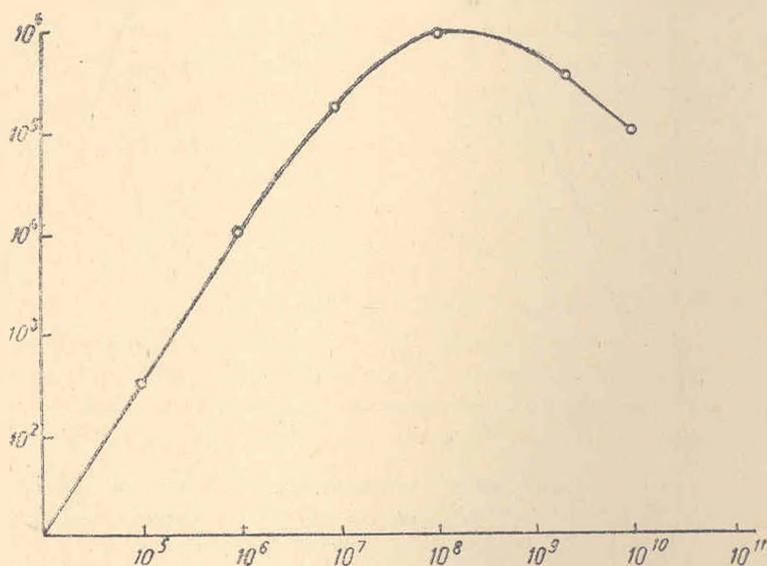


Рис. 1. Зависимость инфекционности ДНК от концентрации клеток реципиента. По оси ординат—количество инфекционных центров в 1 мл; по оси абсцисс—концентрация клеток реципиента в 1 мл.

(3 мкг/мл) с увеличением числа клеток, число инфекционных центров в 1 мл возрастало и достигало оптимальной величины при концентрации  $1,2 \cdot 10^9$  клеток/мл. Дальнейшее увеличение числа клеток приводило к постепенному снижению этого показателя.

Изучение зависимости числа инфекционных центров от концентрации фаговой ДНК показало (рис. 2), что при малых концентрациях

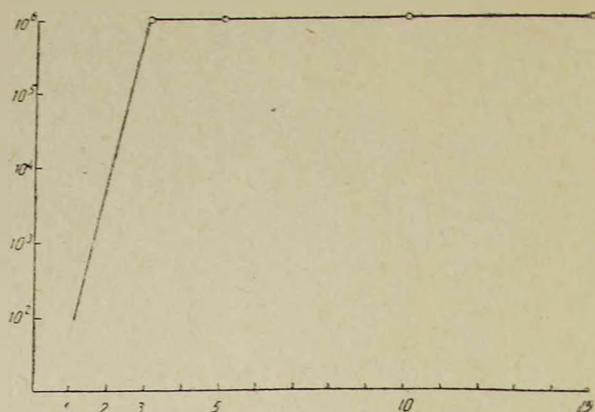


Рис. 2. Зависимость инфекционности ДНК от концентрации ДНК фага. По оси ординат—количество инфекционных центров в 1 мл; по оси абсцисс—концентрация ДНК (мкг/мл).

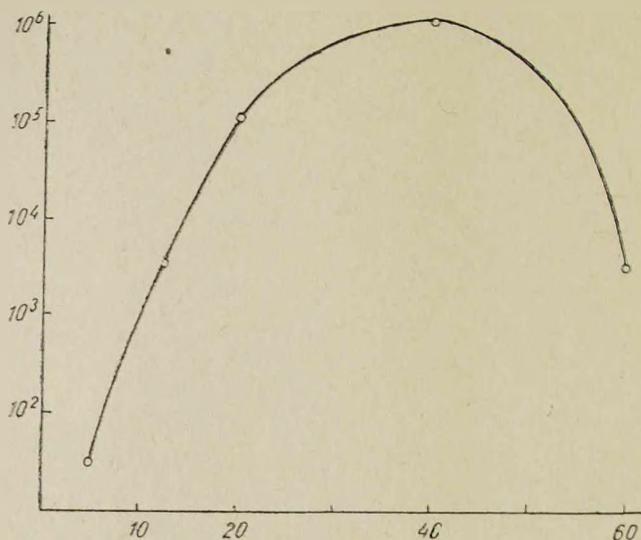


Рис. 3. Кинетика формирования инфекционных центров при инкубации клеток с ДНК при 37°. По оси ординат—количество инфекционных центров в 1 мл; по оси абсцисс—время инкубации (мин).

(максимум 3 мкг/мл) она носит линейный характер, при относительно высоких концентрациях (5–15 мкг/мл) пропорциональная зависимость между концентрацией ДНК и ее биологической активностью не отмечалась. Подобные результаты получены с фагом  $S_D$  и T4 [6, 8], и, вероятно, снижение эффективности трансфекции в наших экспериментах также может быть обусловлено возрастающей конкуренцией биологи-

чески неактивных молекул ДНК с инфекционными молекулами ее, что соответствует представлению об инфицировании сферопластов единичной молекулой ДНК [11, 13, 15].

Известно, что инкубация смеси клеток, обработанных ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и ДНК при  $37^\circ$ , является совершенно необходимым этапом для формирования инфекционных центров [9]. На рис. 3 представлена кинетика этого процесса при инкубации смеси клеток с ДНК. Инфекционную смесь инкубировали при  $37^\circ$  и через различные промежутки времени пробы титровали методом агаровых слоев. На 20-й мин инкубации количество инфекционных центров начинает постепенно нарастать и на 40-й мин достигает максимума, дальнейшая инкубация до 60 мин не приводит к увеличению этого показателя.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изолированная ДНК фага  $\text{dp}8$  обладает биологической активностью, инфекционный титр довольно высок и достигает  $2,10^6$  инф. ц/мл.

Эффективность трансфекции необлученного фага проверялась на радиочувствительных мутантах *S. derby*, различающихся по природе дефекта.

Таблица  
Эффективность трансфекции ДНК фага  $\text{dp}8$  в *S. derby* и  
УФ-чувствительных мутантах

Штаммы	Число инфекционных центров в 1 мл
Дикий тип KE 89	$3,6 \times 10^6$
HCR <sup>-</sup> мутанты KE 80	$4,2 \times 10^5$
KE 118	$2,8 \times 10^3$
KE 134	$1,2 \times 10^4$
HCR <sup>+</sup> мутанты	
KE 24	$2,9 \times 10^6$
KE 82	$1,6 \times 10^6$
KE 157	$4,9 \times 10^5$

Результаты этих опытов представлены в таблице, из которой видно, что фаговая ДНК в мутантах трансфецировалась с нормальной эффективностью. Лишь в мутантах KE 118 и KE 134 она примерно на 2—3 порядка ниже по сравнению с диким KE 89. Это может свидетельствовать о частичном дефекте по рекомбинации или повышении активности внутриклеточных нуклеаз [16].

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 13.X 1978 г.

**dp8 ՖԱԳԻ ԴՆԹ-Ի ՏՐԱՆՏԵԿԵԿՑԻԱՆ ՏԱԼՄՈՆԵԼԼԱ ԴԵՐԿՅ-Ի  
ԵՎ ՌԱԴԻՈԳՆԱՅՈՒՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՄՈՏ**

ժ. Ա. ԿՈՈՅԱՆ, Ե. Ե. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

Աշխատանքում որոշված է ֆագի ԴՆԹ-ի կենսաբանական ակտիվությունը և ուսումնասիրված տրանսֆեկցիայի էֆեկտիվությունը *S. derby*-ի և մուտանտների մոտ:

Տվյալները ջրայց են տալիս, որ dp8 ֆագի ԴՆԹ-ի ինֆեկցիոն տիրու  
հավասար է  $2 \cdot 10^8$  ինֆ. կմլ: Որոշ մուտանտներ տրանսֆեկցիայի էֆեկտի-  
վությունը տարբերվում են S. derby KE 89 վայրի տիպից:

## TRANSFECTION OF PHAGE dp8 DNA IN SALMONELLA DERBY AND RADIOSENSITIVE MUTANTS

Zh. A. KTSOJAN, N. N. SARKISSIAN

The biological activity of isolated phage dp8 DNA has been deter-  
mined and the effectiveness of DNA transfection on radiosensitive mu-  
tants has been studied.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги М., 1961.
2. Вартамян М. К., Карабеков Б. П. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 97, Ереван, 1970.
3. Вартамян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П. Биолог. ж. Армении 30, 9, 14, 1977.
4. Вартамян М. К., Кцоян Ж. А., Карабеков Б. П., Биолог. ж. Армении, 31, 1, 14, 1978.
5. Карабеков Б. П., Вартамян М. К. Мат-лы II научн. конф. Ин-та экспер. биол. АрмССР, 22, Ереван, 1968.
6. Лисовская К. В., Кривиский А. С. Генетика, 12, 10, 100, 1976.
7. Матевосян Н. А., Карабеков Б. П., Вартамян М. К. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 60, Ереван, 1971.
8. Назарова А. Ф. Генетика, 12, 1, 116, 1976.
9. Рудченко О. Н., Лихачева Н. А., Тимакова Н. В., Ильяшенко Б. Н. Вopr. ви-русологии. 4, 446, 1973.
10. Рудченко О. Н., Лихачева Н. А., Тимакова Н. В., Ильяшенко Б. Н. Генетика, 10, 2, 139, 1974.
11. Benzinger R., Kleber I. et all. J. Virol., 7, 647, 1971.
12. Cameron R. et all. Proc. nat. Acad. Sci., 72, 9, 3416, 1972.
13. Cohen G., Limner L. Mol. Gen. Genet., 128, 183, 1974.
14. Gurer A., Schramm G. Nature, 177, 702, 1956.
15. Hertz G., Mauser R. Mol. Gen. Genet., 104, 178, 1969.
16. Lieberman K. P., Oishi M. Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 12, 4816, 1974.
17. Mandel M., Higa A. J. Mol. Biol., 52, 159, 1970.
18. Yamamoto K. et all. Virology, 40, 734, 1970.