

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОЧИСТКИ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК

А. С. АГАБАЛЯН

Проведен анализ литературных данных, посвященных методам выделения, очистки и фракционирования плазмидных ДНК. Анализирован ряд современных биохимических и молекулярно-биологических методов выделения и идентификации ковалентно-замкнутых циркулярных молекул плазмидных ДНК. В свете современных представлений подробно рассматриваются такие методы, как ультрацентрифугирование в градиентах плотности хлористого цезия и сахарозы, электрофорез ДНК в агарозных гелях, фракционирование циркулярных ДНК посредством ионообменной хроматографии и гель-фильтрации на колонках с различными заполнителями. Освещены также разные подходы к лизированию бактериальных клеток.

Ключевые слова: циркулярные ДНК, плазмиды, выделение, очистка, фракционирование.

Плазмиды бактерий представляют собой генетические элементы (детерминанты), которые в отличие от классических генов находятся не в ядерных структурах, а в цитоплазме бактериальных клеток. Поэтому их часто называют экстрахромосомными генетическими элементами, т. е. дополнительными по отношению к хромосомным генетическим элементам, существующим в бактериальных клетках автономно. Вследствие своей автономности, обособленности от хромосомы плазмиды способны к бесконечно долгому поддержанию и воспроизведению.

Это свойство плазмид обусловлено тем, что их репликация осуществляется самостоятельно и независимо от размножения бактерии-хозяина. Можно сказать, что плазмиды—типичные репликоны, т. е. генетические структуры, размножающиеся как целое. Как и все репликоны, они обладают также способностью к саморегуляции своей репликации, независимой от механизмов, регулирующих размножение бактериальной хромосомы. Обычно наличие таких внехромосомных элементов устанавливается по проявлению детерминируемой ими функции: устойчивость к действию антибиотиков, утилизация ряда ароматических соединений, перенос генов при конъюгации, кодирование различных ферментов, токсинов и т. д.

Исследование плазмид и их роли в биологии бактерий имеет большое теоретическое и практическое значение. Благодаря этому стал возможным генетический анализ бактерий, охарактеризована структура генов на молекулярном уровне, выявлена локализация генов и их последовательность на хромосоме бактерий.

Бактериальные плазмиды могут присутствовать в клетках в двух состояниях: либо автономно, независимо от хромосомы, либо объединенными, интегрированными с ней. Последние, способные образовывать с хромосомой клетки непрерывную ковалентно-связанную структуру, называют эписомами. Плазмиды часто придают несущим их бактериям новые свойства. С помощью плазмид осуществляется перенос генетической информации между бактериями, они определяют характер взаимодействия бактерий с другими организмами. Признаки бактерий, определяемые плазмидами, разнообразны, а число их по мере изучения все более увеличивается. Способность плазмид наделять бактерию новыми свойствами, контролируемые геномом плазмид, называется соматической функцией плазмид.

Благодаря всем этим свойствам плазмиды в последние годы широко используются в качестве исходного материала в исследованиях по конструированию новых биологически активных молекул ДНК. С рекомбинантными молекулами ДНК, созданными на основе плазмидных ДНК, сейчас связывают надежды на решение ряда важнейших проблем в биологии.

Известно, что плазмидные ДНК представляют собой циркулярные, ковалентно-замкнутые молекулы. Описанные в ранних работах линейные формы плазмидных ДНК, несомненно, были фрагментированы в процессе их выделения из бактерий. Вероятнее всего эти линейные молекулы (фрагменты) ДНК с молекулярным весом около 10 МД получались при встряхивании со смесью хлороформ—изоамиловый спирт в процессе депротенинизации. Циркулярная природа плазмидных ДНК была установлена генетическими приемами и радиоавтографическим анализом хромосомы *E. coli*, а также биохимическим и электронномикроскопическим изучением ДНК бактериофага λ 174. Вскоре циркулярная форма ДНК была описана для хромосом других бактерий, геномов бактериальных вирусов, некоторых вирусов животных, бактериальных плазмид и митохондрий высших организмов. Развитие физико-химической и электронномикроскопической техники исследований позволило детально изучить структуру циркулярных ДНК, различия в структурных формах этих молекул, имеющих вид суперспирализованных и открытых колец и т. д. Развитие этих методов исследований привело к новым достижениям в трактовке структурных форм ядерной ДНК эукариотов и химической структуры промежуточных форм, синтезирующихся в процессе дубликации циркулярных ДНК.

Первое физическое доказательство циркулярности ДНК было представлено в 1962 г. Файерсом и Синсхеймером [11], которые при изучении структуры односпиральной ДНК фага λ 174 обнаружили, что при щелочном значении рН, 10—12,5, ДНК содержала компоненты, седиментирующие с различной плотностью: быстроседimentирующая форма была способна переходить в более медленную при обработке панкреатической рибонуклеазой (РНК-аза) без появления промежуточных продуктов. Кроме того, быстроседimentирующая форма была рези-

стентна к разрушению экзонуклеазой I. в отличие от медленной. Резюмируя полученные данные, авторы пришли к заключению, что быстроседиментирующая форма ДНК фага $\lambda 174$ имела циркулярную структуру, что впоследствии подтвердилось электронномикроскопически. При изучении ДНК фага было обнаружено, что при прогревании линейного дуплекса ДНК фага при 65° и последующем медленном охлаждении появляется новый компонент, который при нейтральном pH седиментирует в 1,13 раза быстрее, чем линейная форма ДНК фага.

Было установлено, что этот новый компонент представляет собой циркулировавшие в процессе отжига короткие односпиральные комплементарные участки линейной ДНК с когезивными концами. Через некоторое время было показано, что ковалентное связывание таких участков может проходить при обработке экстрактами *E. coli*.

Встречающиеся в природе циркулярные молекулы ДНК были первоначально обнаружены у генома вируса полиомы и у внутриклеточных репликативно-промежуточных структур бактериофага $\lambda 174$. Удалось выявить две циркулярные формы этих дубликатов: быстроседиментирующие ковалентно-замкнутые молекулы (форма I) и более медленно седиментирующие циркулярные молекулы, содержащие одну спираль (форма II). Форма I седиментирует быстрее вследствие более компактной суперспирализованной циркулярной структуры и может переходить в форму II при обработке панкреатической дезоксирибонуклеазой (ДНК-аза). Такая обработка приводит к односпиральному разрыву. Обработка формы I циркулярной ДНК эндонуклеазой EcoR I приводит к образованию линейных молекул, иногда характеризующихся как форма III.

Описаны также и другие циркулярные формы ДНК, соответствующие димерным, тримерным и мономерным молекулам. Эти комплексы были обнаружены в таких разных системах, как внутриклеточные ДНК ряда бактериофагов, вирусов, митохондрий, кинетопластов.

Все циркулярные молекулы ДНК, выделенные из природных систем, имели суперспиральную конформацию. Это свойство, обеспечивающее молекуле ДНК пониженную внутреннюю вязкость, приводит к уменьшению чувствительности к разрывам и объясняет причину более быстрой седиментации суперспирализованных молекул по сравнению с открытыми циркулярными и линейными формами ДНК. У природных циркулярных молекул ДНК плотность седиментации понижается по сравнению с другими формами ДНК, когда ионная сила раствора возрастает (от 0,01 до 1,0 M). При седиментации в щелочных условиях (pH 12,5) ковалентно-замкнутые молекулы ДНК седиментируют быстрее, чем при нейтральном pH. Седиментационный профиль суперспирализованных молекул не изменяется при pH 8,0—11,4, между pH 11,8 и 12,5 отмечается значительное увеличение коэффициента седиментации. При таком значении pH ковалентно-замкнутая ДНК вируса полиомы, которая при нейтральном pH имеет коэффициент седиментации 20 S, седиментирует при 53 S.

Основным этапом при выделении циркулярных плазмидных ДНК из бактериальных клеток является лизирование их. Лизис бактериальных клеток, осуществляемый комбинированным действием ферментов (лизоцим, лизоцистин и др.) и детергентов (ЭДТА, ДОХ, тритон X-100, бридж-58, NL-саркозил, SDS и т. д.), зависит от многих факторов, и в частности от локализации плазмид в бактериальной клетке. Большинство методов, используемых для выделения плазмидных ДНК, основаны на суперспирализованности, ковалентно-замкнутой конформации этих молекул. Например, центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия, адсорбция на нитроцеллюлозах, ускоренная седиментация в щелочном градиенте сахарозы зависят от определенных физико-химических характеристик ДНК. Методы лизиса бактерий, получение осветленных лизатов также требуют индивидуального подхода в каждом отдельном случае. Широко используемый способ лизирования бактериальных клеток при помощи так называемого «детергентного коктейля», содержащего 1%-ный бридж—58, 0,4%-ный ДОХ (дезоксихолат натрия), 0,0625 М ЭДТА, описанный Клевеллом и Хелински [9], целиком и полностью зависит от цитоплазматической локализации ковалентно-замкнутых ДНК, которые не седиментируют с резистентными к действию бриджа клеточными фракциями. Осветленный лизат, полученный после такой обработки, содержит около 2—4% хромосомной ДНК. Гуерри с согр. [12] предложили иной способ лизирования клеток. После предварительного лизирования клеток лизоцимом и ЭДТА полный лизис достигался добавлением к смеси SDS и NaCl высокой концентрации в течение 18—20 часов. Метод отличается доступностью и простотой исполнения и позволяет освободиться от почти 99% хромосомной ДНК. Этот способ в определенной степени является модификацией известного метода, основанного на разделении циркулярной ДНК вируса полиомы от высокомолекулярной клеточной ДНК в присутствии SDS и высокой концентрации NaCl, вследствие чего достигается более полная диссоциация белков от нуклеиновых кислот. Описан еще целый ряд методов выделения плазмидных ДНК с преимущественной цитоплазматической локализацией, являющихся модификациями или комбинациями указанных выше методов [8].

Интересные данные были получены при попытке повысить чувствительность клеток *E. coli* к действию бриджа-58. Оказалось, что комбинированная «лизоцим-версен» обработка клеток на холоду приводит к резкому возрастанию чувствительности клеток к этому детергенту. Кроме того, уровень лизиса во многом зависел также от полной силы смеси и концентрации магния в среде. В то же время при выделении ковалентно-замкнутых плазмидных ДНК из *Staphylococcus aureus* бактериальные клетки лизировали при помощи бацитрацина и лизоцифина с последующим замораживанием при -70° , лизис завершался добавлением к оттаявшей смеси описанного выше «детергентного коктейля». Осветленный лизат, полученный после такой обработки, практически был свободен от хромосомной ДНК. В другой работе клетки бак-

териального штамма *Streptococcus faecalis* подвергали энзиматическому лизису с использованием лизоцима и проназы и последующим добавлением NL-саркозила. Для выделения циркулярных плазмидных ДНК из *Lactobacillus* оптимальным являлось получение NaCl-SDS лизатов и фрагментирование их раздавливанием—«раздавленные лизаты»,—с дальнейшей щелочной, рН 12,5, денатурацией и нейтрализацией. ДНК из подобного раствора экстрагировали смесью фенол—хлороформ—изоамиловый спирт. При таком способе выделения плазмидных ДНК в фенольную фазу уходят практически все линейные и открытые циркулярные формы ДНК, оставляя в водной фазе только ковалентно-замкнутые циркулярные молекулы ДНК.

При выделении плазмидных ДНК из *B. thuringiensis* нами было обнаружено, что для достижения полного лизиса этих клеток необходимо использовать более высокие концентрации лизирующих ферментов, чем обычно применяемые для других бактериальных штаммов [6].

Новый подход к выделению плазмидных циркулярных ДНК был предложен Заслоффом с сотр., для этих целей применяющих так называемую «кислую фенольную депротенинизацию» [19]. Метод основан на использовании фенола для селективной экстракции разных типов ДНК при кислом значении рН и низкой ионной силе. Оптимальное значение рН, позволяющее проводить такое разделение, —4,0, причем уже при рН 4,5 фенол утрачивает способность разделять линейные и открытые циркулярные формы ДНК, и они вместе с ковалентно-замкнутыми формами остаются в водной фазе раздела. При использовании хлористого натрия в концентрации выше 75—100 мМ также утрачивается селективная способность фенола и вся ковалентно-замкнутая ДНК вместе с другими формами переходит в фенольную фазу. Этот метод позволяет фракционировать разные типы ДНК уже в процессе ее экстракции, однако, как впоследствии оказалось, он не эффективен для выделения плазмидных ДНК с молекулярным весом более 25—30 мД.

Все описанные выше методы лизирования бактериальных клеток и выделения плазмидных ДНК успешно применяются при изолировании плазмид с преимущественно цитоплазматической локализацией и молекулярным весом не более 25—30 мД. Иначе обстоит дело, когда плазмиды имеют «околохромосомальную» локализацию. Этот термин, введенный совсем недавно, отражает возможную связь плазмидной ДНК с хромосомой через посредство белкового, или нуклеинового, коннектора, малокопийность плазмиды и большой молекулярный вес плазмидной ДНК. Все эти факты создавали определенные затруднения при выделении и идентификации плазмидных ДНК из целого ряда бактерий [1, 18].

Работами Миллер и Клайн [17] было показано, что ДНК К-фактора *E. coli* в бактериальной клетке связана с хромосомой, причем этот комплекс сохраняется даже после отделения от него мембраны. Проводя физико-химический анализ этого комплекса, авторы устано-

вили, что обработка РНК-азой, но не протеазами, приводит к разделению плазмиды и хромосомы, что позволило предположить наличие РНК-ого коннектора между хромосомой и плазмидой. Этот факт, в дальнейшем подтвержденный несколькими группами исследователей, стал принципиальным при разработке методов получения плазмидных ДНК с околохромосомальной локализацией из бактерий, в которых наличие плазмид, было показано только генетическими приемами. Основным методическим подходом к разработке методов выделения плазмидных ДНК, связанных с хромосомой, стал щелочной гидролиз нуклеиновых кислот. Известно, что суперспирализованные ковалентно-замкнутые ДНК резистентны к щелочной обработке, в то же время все остальные формы ДНК и РНК подвергаются гидролизу. При помощи метода «щелочного лизиса» бактериальных клеток были выделены циркулярные ДНК с большим молекулярным весом (100 мД и выше) из целого ряда бактерий. Этот метод заключался в фрагментировании и щелочной денатурации хромосомной ДНК последующим удалением односпиральных ДНК фенольной экстракцией [13].

Попытки выделить и физически доказать существование плазмид биодеградации из штаммов *Pseudomonas putida* в течение длительного времени были безуспешны, хотя генетически их присутствие в этих штаммах было доказано. Первые данные о физическом существовании плазмид биодеградации были получены Палхаудхури и Чакрабарти с помощью метода щелочной денатурации хромосомной ДНК. Авторам удалось выделить и электронномикроскопически визуализировать ДНК плазмиды биодеградации салциплата из штамма *Pseudomonas putida* АС-36, с молекулярным весом около 50 мД. Нами из штамма *Pseudomonas putida* J1 при помощи щелочного лизиса бактерий с последующей фенольной экстракцией тотальной ДНК и фракционированием ее гель-фильтрацией на сефарозе 4В, хроматографией на колонках с метилированным альбумином была выделена, электрофоретически идентифицирована ДНК плазмиды биодеградации нафталина, молекулярный вес которой, оцененный электрофоретически и электронномикроскопически, находился в пределах 40 мД [1, 4, 18]. Вслед за этими работами были представлены доказательства выделения ДНК плазмид биодеградации толуата, октана ксилола [10, 15]. Молекулярный вес этих ДНК варьировал от 25 до 200 мД. Описанный метод щелочного лизиса позволил выделить и электронномикроскопически визуализировать плазмидную ДНК из *Rhizobium*, молекулярный вес которой был оценен в 400 мД. Метод щелочного лизиса, разработанный для выделения ковалентно-замкнутых циркулярных ДНК, с успехом апробирован на получение плазмид из различных бактериальных штаммов: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Agrobacterium tumefaciens*.

Все описанные выше методы выделения плазмидных ДНК позволяют получать чистые, но в небольшом количестве плазмидные ДНК, которые могут быть использованы только для аналитических целей. Ме-

тод же, предложенный Хюмфрей с сотр., предполагает получение препаративных количеств плазмидных ДНК независимо от их локализации и молекулярного веса. При помощи этого метода выделены плазмидные ДНК с молекулярным весом от 6 до 125 мД [14]. В основе этого метода положено концентрирование осветленных лизатов полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000). Метод с успехом применяется для получения препаративных количеств плазмидных ДНК в целях генной инженерии. Сведения о плазмидных ДНК, выделенных тем или иным способом, некоторых свойствах их суммированы в таблице.

Таблица

Сравнительные методы выделения и фракционирования плазмидных ДНК из различных источников

Источник выделения	Метод лизиса	Очистка	Конформация	Молекулярный вес, мД	Литература
<i>E. coli</i>	SDS—NaCl	Cs cl	КЗЦ	10—15	[12]
<i>E. coli</i>	DOX—бридж—58	Cs cl	КЗЦ	3 15	[9]
<i>E. coli</i>	SDS—NaCl	кислый фенол	КЗЦ	15—20	[19]
<i>Pseudomonas putida</i>	щелочной pH 12,5	Cs cl	КЗЦ ОЦ	36—40	[18]
<i>Pseudomonas putida</i>	щелочной pH 12,5	сефароза 4В, МАК	КЗЦ ОС	37—40	[1]
<i>B. thuringiensis</i>	щелочной pH 12,5	ПЭГ—6000	КЗЦ	70	[13]
<i>B. thuringiensis</i>	SDS—NaCl	сефароза 4В Cs cl	КЗЦ	6, 9, 12	(2, 8)
<i>Pseudomonas putida</i> (криптические)	щелочной pH 12,5	КМЦ—ДНК— целлюлоза	КЗЦ	3—15	[7]

КЗЦ—ковалентно-замкнутые циркулярные ДНК,
ОЦ—открытые циркулярные ДНК.

Следующим этапом при выделении плазмидных ДНК является их последующие фракционирование и очистка. Для фракционирования ДНК могут быть использованы самые разнообразные подходы. Например, в основе методов препаративной хроматографии лежит неодинаковое сродство различных по своей структуре молекул полинуклеотида к определенным обменникам и адсорбентам.

Одним из основных методов фракционирования в настоящее время является ультрацентрифугирование ДНК в градиенте плотности хлористого цезия, позволяющее разделять смесь разных молекул нативной ДНК на компоненты, различающиеся по нуклеотидному составу и конформации молекул. При помощи этого метода можно фракционировать также денатурированную и нативную ДНК, так как денатурированные молекулы ДНК имеют более высокую плотность. Сегодня способ ультрацентрифугирования ДНК в градиенте плотности хлористого

пезия в присутствии интеркалирующей краски широко используется для фракционирования плазмидных ДНК. Ковалентно-замкнутые циркулярные ДНК в отличие от линейных форм связываются с красителем в относительно небольших количествах и образуют с ним комплексы, имеющие сверхспирализованную структуру. В присутствии красителя плотность ковалентно-замкнутых ДНК составляет 1,60 г/см³, а плотность открытых циркулярных и линейных форм находится в пределах 1,56 г/см³. После центрифугирования при 35—40 тысячах оборотов в минуту градиенты анализируют при ультрафиолетовом освещении. При помощи этого метода нам удалось выделить и провести рестрикционный анализ плазмидных ДНК *Bac. thuringiensis* [8].

Во многих случаях для выделения и очистки плазмидных ДНК высокоэффективным оказывается метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Этот метод давно и успешно применяется для очистки и фракционирования различных биологических структур. Суть его состоит в линейном распределении молекул в преформированных градиентах плотности сахарозы в зависимости от плотности исследуемого материала, его молекулярного веса и конформационных характеристик ДНК. Так, при использовании щелочного градиента сахарозы первыми седиментируют ковалентно-замкнутые циркулярные ДНК, тогда как открытые циркулярные и линейные формы в тех же условиях практически не изменяют своего коэффициента седиментации и седиментируют значительно медленнее. Это объясняется тем, что две полинуклеотидные цепи ковалентно-замкнутой ДНК переплетены и при высоком значении рН не могут отделиться друг от друга, образуя единый клубок с более высоким коэффициентом седиментации. В то же время нити линейной и открыто-циркулярных молекул ДНК при подобной обработке расходятся и седиментируют более медленно. Данные, полученные нами при изучении физико-химических параметров ДНК плазмид биодеградации нафталина и салицилата штамма *Pseudomonas putida*, также указывают на высокую эффективность описанного метода фракционирования циркулярных плазмидных ДНК и полностью согласуются с данными других авторов относительно распределения молекул ДНК с различной конформацией в нейтральных и щелочных градиентах сахарозы [15].

Следующим широко применяемым методом фракционирования ДНК, в частности плазмидных ДНК, является ионообменная хроматография. Для получения препаративных количеств фракций ДНК особое внимание в силу простоты и удобства заслуживают методы хроматографического разделения ДНК. Несмотря на ряд недостатков, хроматография ДНК получила широкое применение. Фракционирование на колонках с целлюлозной основой (ДЭАЭ—целлюлоза—эктола—целлюлоза) происходит как по молекулярному весу, так и по составу азотистых оснований. Денатурированные и низкомолекулярные ДНК элюируют с колонок первыми, в то время как другие фракции ДНК связываются с целлюлозой и вымываются значительно позже.

Наиболее успешно для фракционирования плазмидных ДНК с ковалентно-замкнутой циркулярной конформацией применяется метод фракционирования на кизельгуровых колонках с метилированным альбумином (МАК), разделение в которых происходит на основании молекулярного веса, нуклеотидного состава и вторичной структуры ДНК. В наших экспериментах с применением хроматографии ДНК на колонках с МАК удалось фракционировать и в дальнейшем электронномикроскопически идентифицировать ДНК плазмиды биодеградации нафталина [1]. Последняя вымывалась с колонки 0,66 М фосфатным буфером и имела ковалентно-замкнутую циркулярную природу.

Циркулярные плазмидные ДНК с успехом фракционируются на колонках с нитроцеллюлозой, которая сорбирует денатурированные щелочью односпиральные молекулы ДНК, позволяя нативным ДНК элюировать в первых фракциях. Комано и Синсхеймер предложили фракционирование циркулярных ДНК проводить на бензоилированной и нафтолизированной ДЭАЭ-целлюлозе [16]. Этот обменник чувствителен к вторичной структуре молекул, и разделение зависит от относительного содержания односпиральных участков в нуклеиновой кислоте. Фракционирование циркулярных ковалентно-замкнутых плазмидных ДНК проводят также посредством хроматографии на колонках с гидроксипатитом (ГАП). Этот адсорбент устойчив в широком диапазоне рН (5,5—10,0) и температуры. Фракционирование ДНК на ГАП происходит при щадящих условиях. Нативная полимерная ДНК хорошо сорбируется на обменнике и элюирует в виде одного гомогенного пика. Разделение молекул ДНК на ГАП происходит строго по вторичной структуре ДНК. Позже было показано, что денатурированные молекулы фракционируются по нуклеотидному составу, а нативные — по молекулярному весу.

Используя аффинную хроматографию на колонке с карбоксиметил-ДНК-целлюлозой, из штамма *Pseudomonas putida* мы выделяли плазмидные ДНК, функции которых неизвестны, критические плазмиды. Молекулярный вес этих небольших циркулярных ДНК варьировал в пределах 3—15 мД [7]. Нами также был разработан эффективный метод фракционирования циркулярных плазмидных ДНК путем гель-фильтрации тотального препарата депротенизированной ДНК или осветленных лизатов на колонке с сефарозой 4В. Метод позволил получить препаративные количества плазмидных ДНК *Bac. thuringiensis* [2, 3].

Еще одним и, по-видимому, самым популярным методом фракционирования циркулярных молекул ДНК является электрофорез ДНК в агарозных гелях. Нужно сказать, что ДНК эукариотических хромосом, хлоропластов и больших вирусов имеют молекулярный вес около 100 мД и выше. Такие ДНК обычно не разделяются электрофоретически при использовании стандартной концентрации агарозы (0,6—0,7%) и в то же время ДНК бактериофага с молекулярным весом около 500 мД прекрасно фракционируется в 0,1%-ном геле. Приведенный пример говорит о том, что данный метод практически не лимитирован размерами

исследуемых молекул. Метод позволяет совершенно четко идентифицировать все формы ДНК по их электрофоретической подвижности, конформационным типам и с той или иной степенью точности оценивать молекулярный вес их. Широкое применение метода обусловлено также тем, что сегодня он является практически единственным для проведения рестрикционного анализа ДНК и характеристики полученных фрагментов [5].

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что в последние 10—15 лет сделан большой скачок в разработке методов выделения и получения препаративных количеств очищенных плазмидных ДНК. Это объясняется бурным развитием молекулярной биологии и ее новой области, генетической инженерии, области, изучающей возможности и способы создания генетических структур и наследственно измененных организмов. В целом эта задача сводится к созданию *in vitro* молекул ДНК, посредством соединения фрагментов ДНК—рекомбинантных ДНК. Одним из компонентов рекомбинантной ДНК является «вектор», обеспечивающий механизм репликации и экспрессии. С этой точки зрения плазмиды являются наиболее оптимальными векторами, что в свою очередь указывает на первостепенность получения высокоочищенных плазмидных ДНК в препаративных количествах и изучения их физико-химических и биологических свойств. Эта проблема решается во многих лабораториях мира.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 30.VII 1980 г.

ՊԼԱԶՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԵՎ ԲԱԺԱՆՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿԱԿԻՑ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Ա. Ս. ԱԳԱԲԱԼԻԱՆ

Հոդվածում արվում է պլազմիդային ԴՆԹ-ների անջատման և մաքրման մեթոդներին նվիրված գրականության վերլուծությունը:

Քննվում են մի շարք ժամանակակից բիոքիմիական և մոլեկուլյար-կենսաբանական մեթոդներ՝ շրջանակային պլազմիդային ԴՆԹ-ների անջատման և որոշման վերաբերյալ:

Բերվում են նաև բակտերիալ բջիջների լիդիսի տարբեր ձևերը, որոնք կախված են այնպիսի պայմաններից, ինչպիսիք են պլազմիդային ԴՆԹ-ների լուկալիզացիան, բջիջների մեջ, բակտերիաների ղգայնությունը տարբեր դեանրգենտների, իոնային ուժերի, pH, ֆերմենտների, որոնք օժանդակում են ստանալու մաքսիմալ քանակի պլազմիդային ԴՆԹ-ները:

CONTEMPORARY METHODS OF ISOLATION, PURIFICATION AND FRACTIONATING OF PLASMID DNA

A. S. AGABALIAN

The analysis of literature data concerning methods of isolation-purification and fractionating of plasmid DNA is presented in the paper.

Some up-to-date biochemical and molecular-biological methods of isolation and identification of covalently closed circular molecules of plasmid DNA have been analysed. Methods of ultracentrifugation in density gradients of CsCl and saccharose, agarose gel electrophoresis, fractionating of circular DNA by chromatography and gelfiltration have been considered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабян А. С., Захарян Р. А., Акопян С. М., Бакунц К. А., Израелян Ю. А., Азарян Н. Г. Микробиология, 1, 97, 1979.
2. Агабян А. С., Чарчоглян А. А., Бакунц К. А., Гаспарян Н. С., Захарян Р. А. Биолог. ж. Армении, 1, 8, 1978.
3. Захарян Р. А., Агабян А. С. III Всесоюзн. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов», 87, М., 1976.
4. Захарян Р. А., Агабян А. С., Акопян С. М., Кочарян Ш. М., Боронин А. М. ДАН СССР, 232, 482, 1977.
5. Захарян Р. А., Агабян А. С., Чил-Акопян Л. А., Бакунц К. А., Татевосян П. Е., Африкян Э. К. ДАН АрмССР, 1, 42, 1976.
6. Захарян Р. А., Агабян А. С., Захарян Э. Г., Израелян Ю. А., Африкян Э. К. Генетика актиномицетов и бактерий, 249, Ереван, 1978.
7. Захарян Р. А., Агабян А. С., Акопян С. М., Гаспарян Н. С., Кочарян Ш. М. Биолог. ж. Армении, 8, 818, 1978.
8. Захарян Р. А., Израелян Ю. А., Агабян А. С., Татевосян П. Е., Акопян С. М., Африкян Э. К. Микробиология, 2, 226, 1979.
9. Cleweell D., Helinski D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 1159, 1969.
10. Duggleby S., Baylay S., Worsey M., Williams P., Broda P. J. Bacteriol, 130, 1274, 1977.
11. Fiers W., Sinsheimer R. J. Mol. Biol., 5, 227, 1978.
12. Guerri P., de Blance D., Falkow S. J. Bacteriol., 116, 1064, 1973.
13. Hansen J., Olsen R. J. Bacteriol., 135, 227, 1978.
14. Humphres G., Willshaw G., Anderson E. Biochem. Biophys. Acta, 383, 457, 1975.
15. Johnston J., Gunsauls J. Biochem. Biophys. Res. Commun, 75, 13, 1977.
16. Komano T., Sinsheimer R. Biochem. Biophys. Acta, 155, 295, 1968.
17. Miller J., Kline B. Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington, 102, 1976.
18. Palchaudhuri S., Chakrabarty A. J. Bacteriol., 126, 410, 1976.
19. Zasloff M., Ginder G., Felsenfeld G. Nucl. Acids Res, 5, 1139, 1978.