

УДК 575.113:576.8

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Р. Р. АЗИЗБЕКЯН

Рассмотрены отдельные аспекты генетики *Bacillus thuringiensis*: общая трансдукция, плазмидная трансформация протопластов, слияние протопластов, плазмиды, клонирование генетических детерминант синтеза инсектицидного белкового токсина.

Ключевые слова: энтомопатогенные бактерии, трансдукция, протопласты, плазмиды, клонирование генов.

Энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* различных серотипов широко используются в качестве средств защиты растений [4].

Используемые в производстве штаммы выделены из природных источников и не всегда отвечают технологическим требованиям при промышленном культивировании. Кроме того, производство осложняется рядом факторов, среди которых важно отметить нестабильность проявления признака токсинообразования и фаголизис. Решение этих задач потребовало разработки частной генетики *Bac. thuringiensis*, что позволит расшифровать механизмы генетической детерминированности токсинообразования и особенности взаимоотношений в системе *фаг—клетка Bac. thuringiensis*.

Выделение маркированных штаммов и поиски способов переноса генетической информации явились необходимой предпосылкой для разработки частной генетики *Bac. thuringiensis*. В настоящее время показаны следующие методы обмена генетической информацией у *Bac. thuringiensis*: общая трансдукция, плазмидная трансформация протопластов, слияние протопластов.

Общая трансдукция. Трансдукция продемонстрирована для штаммов различных серотипов, в том числе и имеющих промышленное значение.

Баржак сообщалось о возможности трансдукции прототрофности, при этом трансдуцируемый штамм приобретал новый жгутиковый антиген, т. е. имела место также трансдукция признака(ов), определяющего серотип [14]. Алешкину с соавт. удалось трансдуцировать признаки стрептомицинрезистентности и витаминнезависимости [3]. Обращает на себя внимание очень высокая инаktivация клеток реципиентного штамма при контакте с трансдуцирующим фагом (выживаемость 0,05%). Видимо, именно этим обстоятельством следует объяснить относительно высокий уровень трансдукции, который в данном случае оценивался по отношению числа трансдуцированных бактерий к числу выживших бактерий после их контакта с фагом.

Оптимизация условий трансдукции у *Bac. thuringiensis* была осуществлена в лаборатории Торна [29]. Использовались выделенные из

почвы фаги CP-51 и CP-54. Максимальный уровень трансдукции штаммов вариантов *thompsoni*, *finitimus*, *alesti* (анализировалась возможность передачи ряда генетических признаков) наблюдался при соблюдении следующих условий: выбор оптимальной множественности инфекции фагом, использование УФ-инактивированного фага (выживаемость—1%), отбор прототрофных трансдуктантов на слабообогатщенной среде, применение антифаговой сыворотки. Предполагалось, что снижение числа трансдуктантов может быть обусловлено повторной инфекцией фагом и лизисом клеток. Вместе с тем следует указать, что на обедненных средах литические свойства фагов, как правило, проявляются сильнее, чем и объясняется, видимо, обнаружение на минимальных средах слаборастущих трансдуктантов. Использование антифаговой сыворотки было необходимо только в случае с хорошо адсорбирующим фагом CP-51. В качестве факторов, обеспечивающих эффективную трансдукцию, следует указать присутствие в среде солей Na^+ или K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} . Фаги CP-51 и CP-54 осуществляли генерализованную трансдукцию генетических маркеров с частотой 10^{-6} — 10^{-7} .

Фаг CP-51 использовали для оценки возможности совместной трансдукции сцепленных признаков. Были выделены две группы сцепления, первая из которых включала маркеры *trp 1*, *cys 1*, *cys 2*, но не *met-1*; вторая—состояла из маркеров *met-1*, *arg-1*, *arg-2*, но не *arg-3*. Другая группа сцепления маркеров антибиотикустойчивости, *nal-rif-strA*—*spcA*, была выявлена Ландеком с соавт. [20]. Используя возможность замены факторов роста у ауксотрофных мутантов *Bac. thuringiensis*, авторы провели сравнение с фенотипически сходными штаммами *Bac. subtilis*, и в ряде случаев была показана общность метаболических путей.

Более высокие значения частот генерализованной трансдукции (10^5 — 10^6) были получены с фагом TP-13, обладающим конвертирующей способностью [25]. Фаг TP-13 был выделен из почвы с использованием в качестве обогащающего фактора акристаллического штамма варианта *sotto*. Фаг TP-13 конвертировал Spo^- Cry^- штаммы на споро- и кристаллообразование независимо от бактериального донора, на котором размножался. При инфекции фагом TP-13 в жидкой среде наблюдалось увеличение числа спорообразующих клеток в 10^6 раз, которые при этом приобретали способность к кристаллообразованию. Исходя из сопряженности признаков споро- и кристаллообразования, а также на основании экстраполяции данных о локализации генов споруляции на хромосоме *Bac. subtilis*, авторы выдвинули предположение о том, что генетические детерминанты токсинообразования *Bac. thuringiensis* должны быть локализованы также на хромосоме. Однако, как будет ясно из последующего изложения, вопрос о хромосомной или плазмидной локализации должен решаться конкретно для каждого штамма.

С использованием умеренных фагов, выделенных в нашей лаборатории, впервые удалось осуществить трансдукцию штаммов вариантов *dendrolimus*, *galleriae*, *israelensis* [10]. Табл. 1 показывает, что максимальная частота трансдукции большинства изученных маркеров при-

ближается к теоретически ожидаемой, 10^{-5} . Показана также возможность прямой и реципрокной межвариантной трансдукции между штаммами *galleriae* и *dendrolimus*, *galleriae* и *israelensis*.

Разработка метода общей трансдукции позволяет получать штаммы с заданными свойствами. Как косвенный вывод, из результатов опытов по межвариантной трансдукции следует, что отдельные области геномов штаммов различных серотипов «консервативны», т. е. в процессе дивергенции различных серотипов эти области не претерпели существенных изменений. Вместе с тем следует отметить, что эффективность трансдукции одного и того же маркера зависела в ряде случаев от донорного штамма, на котором размножался фаг (табл. 1).

Таблица 1

Трансдукция штаммов различных серотипов *Bac. thuringiensis*

Фаг	Серотип		Селектируемый маркер	Частота трансдукции
	штамма-донора	штамм-реципиента		
Tg13	V	V	Thy ⁺	$2,5 \cdot 10^{-5}$
			Ade ⁺	$3,7 \cdot 10^{-6}$
			Gua ⁺	$5,8 \cdot 10^{-6}$
			Ura ⁺	$1,6 \cdot 10^{-6}$
			Trp ⁺	$9,2 \cdot 10^{-6}$
			Tet ^R *	$2 \cdot 10^{-6}$
Tg13	V	IV	Trp ⁺	$6 \cdot 10^{-7}$
Tg13	IV	V	Gua ⁺	$5,2 \cdot 10^{-7}$
Tg18	V	V	Thy ⁺	$4,1 \cdot 10^{-7}$
			Ade ⁺	$3,2 \cdot 10^{-7}$
			Gua ⁺	$1,9 \cdot 10^{-7}$
CP-55	V	V	Thy ⁺	$7 \cdot 10^{-7}$
			Gua ⁺	$2 \cdot 10^{-7}$
			Str ⁺	$1,5 \cdot 10^{-7}$
CP-55	XIX	XIV	Trp ⁺	$1 \cdot 10^{-6}$
CP-55	XIV	V	Ery ^R	$4 \cdot 10^{-6}$

* Трансдуцировался признак устойчивости к 125 мкг/мл тетрациклина.

Аналогичные данные были получены при трансдукции фагами CP-51 и CP-54 [21]. Так, ауксотрофы варианта *thompsoni* могли быть трансдуцированы лишь в случае, если фаг развивался на исходном прототрофном штамме. Вместе с тем ауксотрофы вариантов *finitimus* и *alesti* трансдуцировались, когда в качестве донора использовали штаммы *finitimus*, *alesti*, *galleriae*, *sotto*, *entomocidus-limassol*. При использовании в качестве доноров штаммов других серотипов трансдукция оказывалась неэффективной. Для фага CP-54 *Ber* оптимальным донором служил штамм серотипа *tolworthi*.

Одной из возможных причин неспособности фагов к межвариантной трансдукции может быть наличие у реципиентных бактерий системы рестрикции немодифицированных фаговых ДНК.

Плазмидная трансформация протопластов. Имеется лишь одно сообщение о генетической трансформации хромосомной ДНК *Bac. thuringiensis* [19].

С развитием методов получения протопластов возникла возможность плазмидной трансформации.

Плазмида pC194, детерминирующая устойчивость к хлорамфениколу, была использована для трансформации протопластов к антибиотикустойчивости. В нашей лаборатории реципиентом служил безплазмидный штамм 48 var. *galleriae*. Выделение из антибиотикустойчивых клеток *Bac. thuringiensis* плазмидной ДНК с электрофоретической подвижностью, аналогичной подвижности плазмиды pC194, а также способность такой ДНК трансформировать клетки *Bac. thuringiensis* к хлорамфениколу устойчивости явились прямыми доказательствами плазмидной детерминированности данного признака в трансформированных клетках. Интересно отметить, что плазмидная ДНК, выделенная из трансформантов *Bac. thuringiensis*, обладала большей трансформирующей способностью, чем ДНК, выделенная из *Bac. subtilis* (табл. 2).

Таблица

Трансформация протопластов *Bac. thuringiensis* плазмидой pC194

Источник плазмидной ДНК	Интактные клетки, %	Титр колоний после контакта с ДНК на агаре			Частота трансформации
		Хоттингера	регенерационном	регенерационном с СМ	
<i>Bac. subtilis</i> 364 (выделение в градиенте CsCl)	0,05	$5 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^0$	$2 \cdot 10^{-6}$
	2,5	$4 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^0$	$1 \cdot 10^{-7}$
<i>Bac. subtilis</i> 364 (выделение щелочным методом)	0,01	$6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^0$	$1 \cdot 10^{-5}$
	0,03	$2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^0$	$2 \cdot 10^{-6}$
<i>Bac. thuringiensis</i> (выделение щелочным методом)					
трансформант № 1	0,01	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^{-7}$
трансформант № 1	0,3	$3,2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^{-5}$
трансформант № 6	0,3	$4 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^{-5}$
трансформант № 10	0,01	$1,3 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-3}$

В отличие от этих данных, Мартину с соавт. [23] не удалось трансформированных клетках *Bac. thuringiensis* var. *kurstaki* выявить плазмидную ДНК, что было объяснено возможностью интеграции плазмидной ДНК в хромосому, с допущением, что плазмида pC194 способна действовать как JS-элемент. В то же время устойчивость к антибиотикам не была обусловлена изменениями в проницаемости клеточных стенок, поскольку в трансформированных клетках обнаруживалась активность хлорамфениколтрансферазы—фермента, генетическая детерминанта которого локализована на плазмиде pC194.

Лимитирующими факторами при плазмидной трансформации протопластов могут быть: уровень протопластирования клеток, эффективность регенерации протопластов в вегетативные клетки, несовместимость трансформирующей плазмиды с резидентными плазмидами реципиента. При увеличении доли протопластов в популяции и повышении числа регенерирующих протопластов значительно возрастала частота трансформации. В то же время наличие в клетках *Bac. thuringiensis* крипточеских плазмид не влияло на уровень плазмидной трансформации и стабильное наследование плазмид [24]. Существующие в настоящее время системы для молекулярного клонирования *Bac. subtilis* плазмидами pC194, pBC16, pB110 [2, 11, 23, 24] могут быть использованы для адаптации технологии генной инженерии для *Bac. thuringiensis*. Возможный прикладной аспект—создание штаммов с увеличенным числом копий гена(ов), детерминирующего синтез кристаллического токсина, или конструирование гибридных плазмид с набором различных генов токсинообразования *Bac. thuringiensis* с последующей их трансформацией в соответствующие реципиентные штаммы, что позволит получить штаммы с расширенным спектром инсектицидного действия.

Слияние протопластов. Слияние протопластов как метод получения рекомбинантных штаммов удобен в случае использования микроорганизмов, для которых не разработаны другие способы обмена генетической информацией. Этот метод был использован для штаммов *Bac. thuringiensis* [7]. Использовали множественно маркированные штаммы *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*. После обработки клеток лизоцимом и полиэтиленгликолем смесь высевали на осмотически стабилизированную селективную среду. Частота появления так называемых первичных колоний на селективных средах составляла $10^{-4} - 10^{-5}$.

Клональный анализ первичных колоний выявил следующие классы—смешанные клоны, в которых рекомбинанты существовали нестабильно в ряде генераций, клоны, состоящие из смешанной популяции (родители или рекомбинанты) стабильных форм, клоны, дающие стабильные рекомбинанты. На частоту появления рекомбинантов влияло УФ облучение смеси слившихся протопластов.

Наличие нестабильных гетерогенот осложняет генетический анализ сцепленности маркеров. В то же время относительная простота метода и достаточно высокий уровень отбора стабильных рекомбинантов ($\sim 10^{-4}$) позволили приступить к конструированию штаммов с необходимыми признаками.

Метод слияния протопластов был использован также для получения межвидовых рекомбинантов [12]. В качестве родителей использовали штаммы *Bac. thuringiensis* 48 Thi-Nic-Gua-Rif^R Str^R и 56 Gua-Rif^R и *Bac. cereus* JP-7 (pBC16). Последний содержал плазмиду pBC16, детерминирующую устойчивость к тетрациклину. Селективными маркерами при отборе рекомбинантов служили устойчивость к рифампицину и тетрациклину. Частота обнаружения Rif^R Te^R-клонов составляла $10^{-5} - 10^{-6}$. Выделенные клоны анализировали по ряду признаков—потребности в факторах роста, устойчивости к стрептомицину и фагам, морфологии колоний. Большинство клонов имели смешанный

фенотип, т. е. были рекомбинантами. Особенно интересно, что рекомбинантные штаммы отличались по фагочувствительности, что было обусловлено изменением фагадсорбирующей способности (табл. 3). Следует отметить, что рекомбинанты, как и родительский штамм *Bac. cereus* JP-7 (pBC16), индуцировались к антибиотикустойчивости в присутствии малых доз тетрациклина. В клетках рекомбинантов были обнаружены плазмидные ДНК с подвижностью плазмиды pBC16, что подтвердило возможность передачи плазмид в процессе слияния протопластов. Представленные данные свидетельствуют о возможности использования метода слияния протопластов для создания рекомбинантных штаммов *Bac. thuringiensis* с необходимыми признаками.

Таблица 3

Характеристика рекомбинантов, полученных при слиянии протопластов
Bac. thuringiensis 48 и *Bac. cereus* JP-7 (pBC16)

Штамм	Тетрациклин в среде предва- рительного куль- тивирования	Эффективность посева бактерий на агаре с 100 мкг/мл тет- рациклина	Эффективность посева фагов			Адсорбция фага 1g 12, $\times 10^{-9}$ мл/мин
			Tg4	Tg12	Td15	
<i>Bac. thuringiensis</i> 48	нет	$<10^{-8}$	1	1	1	3,2
	да	$<10^{-8}$				
<i>Bac. cereus</i> JP-7 (pBC16)	нет	$2 \cdot 10^{-4}$	$<10^{-6}$	$<10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-7}$	0,9
	да	10^{-1}				
Рекомбинанты 29	нет	10^{-3}	1	$2 \cdot 10^{-5}$	$<5 \cdot 10^{-7}$	2,8
	да	10^{-2}				
65	нет	10^{-3}	1	$<10^{-4}$	$<5 \cdot 10^{-7}$	X
	да	10^{-1}				

Нестабильность проявления генетических признаков Bac. thuringiensis. Широкое использование микроорганизмов для промышленного культивирования обусловило необходимость изучения механизма(ов) генетической нестабильности, поскольку известно, что в процессе хранения и последовательных пересевов у штаммов микроорганизмов изменяется ряд технологически важных признаков. В связи с этим задача стабилизации генетических признаков приобретает актуальность.

В процессе выделения и идентификации биохимических мутантов *Bac. thuringiensis* нами была обнаружена генетическая нестабильность ряда признаков, определяющих потребность в ростовых факторах [1]. При длительном хранении у аукоотрофных мутантов «возникала» дополнительная потребность в аминокислоте(ах). Клональный анализ показал, что у большинства клонов возникает аргининзависимость, частота появления таких клонов составляла 30–90%. В дальнейшем было показано, что дополнительная потребность в аргинине не является стабильной—после ряда последовательных пересевов она исчезала. Вместе с тем появление аргининзависимых клонов не было обус-

ловлено гетерогенностью изучаемых штаммов, поскольку аргининзависимые клоны выявлялись также при клональном анализе колоний, выросших на минимальном агаре. Имеется ряд доказательств в пользу предсуществования признака аргининнедостаточности, а не возникновения его в результате спорообразования или хранения. Генетическая нестабильность по признаку аргининнедостаточности коррелировала с признаком тетрациклинчувствительности. Для штаммов, зависимых от витаминов, наблюдалась аналогичная корреляция между витаминзависимостью и тетрациклинчувствительностью.

Получены также данные о возможности выделения множественных прототрофных ревертантов при культивировании в неблагоприятных условиях, при этом частота их появления значительно превышала возможную вероятность обнаружения в результате независимых одиночных мутационных событий. Однако пассирование через полноценную среду приводило к потере большинством клонов способности к росту на «голодной» среде.

Приобретение «дополнительной потребности» при спорообразовании или длительном хранении может носить защитный характер, так как в данном случае вероятность прорастания спор в неблагоприятных условиях снижается. Вместе с тем известна относительно слабая прорастаемость спор *Bac. thuringiensis*, что, по мнению ряда авторов, обусловлено эволюционно закрепленной способностью энтомопатогенных микроорганизмов к прорастанию в условиях полноценного питания в организме насекомых [28].

В штамме 351 *galleriae* была выявлена другая группа нестабильных генетических признаков [13]. У двойных мутантов $\text{Thy}^- - \text{Tds}$, дефектных по тимидилатсинтезазе и дезоксирибоальдолазе, возможно было выделение двойных ревертантов с высокой частотой, $10^{-7} - 10^{-8}$, при этом изменялась также морфология колоний—они образовывали колонии R-морфологии. Для множественных ревертантов была характерна также устойчивость к фагу Tg4, а в ряде случаев и к тетрациклину. Предынкубация клеток в обедненной среде без глутамата стимулировала $S \rightarrow R$ и одновременно повышала частоту образования множественных ревертантов до $10^{-4} - 10^{-6}$.

Введение мутаций стрептомицинустойчивости оказывало двоякий эффект. Мутация Str^R-1 блокировала способность к множественной реверсии, т. е. оказывала стабилизирующее действие, мутация Str^R-2 не стабилизировала штаммы. Механизм одновременной реверсии по ряду маркеров не ясен, однако выявленная нестабильность полученных штаммов позволяет предполагать, что данный процесс может быть обусловлен изменениями генетического материала, вызываемого дупликациями, включением «молчащих» генов, встройкой транспозоноподобных элементов и т. д.

Трансдукция признака Str_R-1 сообщала штаммам стабильность, т. е. они теряли способность к множественной реверсии, в то время как Str^R-2 трансдуктанты имели нестабильность по изученным признакам.

Плазмиды Bac. thuringiensis. Первые косвенные доказательства плазмидной локализации гена(ов) токсинообразования были получены

в работе Дебабова с соавт. [8], которые показали, что кристаллообразующие штаммы *Bac. thuringiensis* содержат комплекс плазмид, в то время как в клетках всех акристаллических вариантов, полученных спонтанно или при воздействии бромистого этидия, они не обнаруживались. Эти данные были подтверждены результатами целой серии работ, в которых изучался плазмидный профиль бактерий *Bac. thuringiensis* [6, 15—18, 27]. Поскольку плазмиды *Bac. thuringiensis* в какой-то степени являются уникальными как по молекулярной массе (ММ) (описана плазида с ММ 280 мегадальтон), так и по количеству классов, представляет интерес привести краткую характеристику плазмид, выделяемых из штаммов различных серотипов. Тем более что, по мнению ряда авторов, «гигантские» плазмиды могут быть результатом кольцевания отдельных фрагментов хромосомной ДНК [15, 16].

Рядом исследователей были предприняты попытки установить корреляцию между наличием плазмид и способностью клеток *Bac. thuringiensis* синтезировать кристаллический токсин.

В клетках кристаллообразующего штамма варианта *kurstaki* было выявлено 6 классов плазмид с ММ от 0,66 до 23,33 мегадальтон [27]. В клетках трех акристаллических штаммов, полученных под влиянием различных обработок, плазмиды не выявлялись. По мнению авторов, очень высокая частота появления акристаллических вариантов может свидетельствовать об определенной роли нестабильных генетических элементов—плазмид—в детерминировании кристаллообразования [28]. Наиболее интересно, что в акристаллических штаммах наблюдалась потеря сразу всех классов плазмид, что могло быть связано с методом получения этих вариантов при повышенной температуре. В этом случае возможна термоинактивация специфического белка, необходимого для репликации всех плазмид, либо, альтернативно, все плазмиды могли иметь общее происхождение или общий сайт репликации, инактивируемый при нагревании.

Для экстрахромосомальных элементов ДНК, выделяемых из клеток *Bac. thuringiensis*, характерна множественность форм или классов, хотя некоторые классы могут представлять мультимеры плазмид с меньшей молекулярной массой. Из большинства штаммов выделяются 3—12 классов. Имеется широкое разнообразие в размерах плазмид—от 0,66 до 280 мегадальтон [17]. В некоторых случаях, несмотря на сходные размеры контурных длин ДНК, их можно разделить при электрофорезе в агарозном геле.

Плазмиды, выделенные из бактерий варианта *alesti*, на основании электронномикроскопического анализа контурных длин молекул были отнесены к 12-ти классам, с диапазоном ММ—2,6—44,58 мегадальтон [28].

Следует отметить, что число классов в штаммах одного и того же серотипа было различно. Так, штаммы варианта *kurstaki* содержали от 1 до 12 классов с ММ от 0,74 до 52 мегадальтон [17, 27]. Видимо, плазмидный профиль скорее отражает различия в штаммах, нежели в вариантах. Интересно, что даже в клетках штаммов-производных штамма 69-6R варианта *galleriae* были обнаружены различия как в чи-

сле классов плазмид, так и в их ММ [5]. Определение числа классов плазмид осложняется разным относительным содержанием их. Так, в клетках варианта *thuringiensis* содержание плазмидных ДНК с молекулярной массой 10,3 мегадальтон составляло менее 1% от общей массы всех плазмид [15]. Аналогичная картина выявлялась и для ряда других плазмид, выделяемых из бактерий других вариантов. Кроме того, серьезные трудности возникают в связи с различиями в конфигурации молекул. Известно, что молекулы плазмид могут быть представлены следующими формами: ковалентно замкнутые кольцевые (ССС), релаксированные или открытые кольца (ОС) и линейные. Вследствие разрывов в одной или обеих нитях ДНК в процессе выделения и очистки молекулы плазмид могут быть в различных конфигурациях и в результате обнаруживать различную электрофоретическую подвижность. Следовательно, определение плазмидного профиля штаммов целесообразно проводить двумя независимыми методами—по электрофоретической подвижности плазмид в агарозном геле и измерением контурной длины молекул. Именно электронномикроскопическое измерение «плазмидных молекул» позволило выявить «гигантские» плазмиды в клетках варианта *berliner* 1715 с ММ 100, 120 и 180 мегадальтон [22]. Электронномикроскопическое изучение плазмидных ДНК позволяет одновременно количественно оценить встречаемость плазмид определенной мол. массы в препаратах. Так, в препаратах плазмидных ДНК из клеток *kurstaki* были измерены 532 молекулы. Оказалось, что из 6-ти классов плазмид 2 плазмиды с ММ 1,32 и 5,45 мегадальтон составляли 35,7 и 37,6% соответственно от числа измеренных молекул. В то же время плазида с ММ 23,33 мегадальтон обнаруживалась с частотой лишь 1,3% [27]. Аналогичная ситуация была выявлена в препаратах плазмид из варианта *alesti*. Плазида с ММ 4,75 мегадальтон встречалась с частотой 28,6%, хотя плазида с ММ 18,12 мегадальтон составляла лишь ~1% молекул [28].

Одним из интригующих вопросов является вопрос о возможной гомологии между плазмидами, выделенными из одного штамма и из бактерий разных вариантов. Рестрикционный анализ плазмидных ДНК может в какой-то степени дать ответ на этот вопрос. Так, при рестрикционном анализе плазмид, выделенных из штамма *thuringiensis*, было выявлено, что все три плазмиды (с ММ 6,52, 6,13 и 7,20 мегадальтон) имеют один сайт узнавания для эндонуклеазы *Sal* I. Рестриктаза *Eco*RI имела два сайта узнавания на большой плазмиде, один сайт на плазмиде с ММ 6,24 мегадальтон и не имела сайтов на плазмиде с ММ 6,52 мегадальтон [24].

Три плазмиды штамма *caucasicus* при гидролизе рестриктазой *Eco*RI также проявили различный рестрикционный профиль [9]. Эти данные свидетельствуют о разной нуклеотидной последовательности либо по всей длине молекул плазмид, либо отдельных фрагментов. Однако с плазмидами с большей ММ обнаруживается другая закономерность. Так, при рестрикции эндонуклеазами *Eco*RI и *Hind*III плазмид из варианта *subtoxicus* (ММ 52 и 56 мегадальтон) было выявлено значительное количество общих последовательностей ДНК в обеих плаз-

мидах [22]. Методом гибридизации по Санзерну было показано, что в штамме berliner 1715 плазмиды из двух больших групп (с ММ до 15 мегадальтон) не имеют гомологии. Однако в пределах самих групп наблюдается частичная консервация последовательности ДНК. Второй аспект—наличие гомологии между плазмидами и хромосомной ДНК. В данном случае также проявились различия между плазмидами из различных классов—в то время как в больших плазмидах обнаруживалась последовательность ДНК, аналогичная хромосомной ДНК, в маленьких плазмидах (до 15 мегадальтон) из серотипов berliner и kurstaki такой гомологии выявить не удалось.

Клонирование гена(ов), детерминирующего синтез кристаллического токсина. Накопившиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что в некоторых случаях генетические детерминанты токсинообразования *Bac. thuringiensis* локализованы на плазмидах. Прямые доказательства были представлены в работе Шнепфа и Уайтли [26]. Была получена фракция «больших» (47 и 30 мегадальтон) плазмид *Bac. thuringiensis* var. *kurstaki* НД-1 и осуществлен гидролиз эндонуклеазой *Sau* 3a I. В качестве молекулярного вектора использовали плазмиду pB322, детерминирующую устойчивость к тетрациклину и ампициллину. Внедрение фрагментов плазмидной ДНК *Bac. thuringiensis* осуществляли в *Bam* HI сайте плазмиды pBR322, локализованном в гене, кодирующем устойчивость к тетрациклину. Поскольку в гене тетрациклинустойчивости была встроена чужеродная последовательность ДНК, отбор трансформированных клонов *E. coli* HB101, несущих гибридную плазмиду, вели по устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Был идентифицирован клон ES12, специфически реагирующий с антителами к кристаллическому токсину. Плазмида pES1, выделенная из данного клона, имела ММ 11 мегадальтон и была способна трансформировать ампициллинустойчивость, при этом все Amp^R -трансформанты реагировали с иммунной сывороткой к токсину. Экстракты, выделенные из трансформированных клеток *E. coli*, обладали токсическим действием на гусениц. Электрофоретическая подвижность белков из *Bac. thuringiensis* и трансформированных клеток *E. coli* была аналогичной.

Сумма этих данных строго указывает, что ДНК, интегрированная в плазмиду pE 1, содержит ген, детерминирующий токсинообразование, и этот ген экспрессируется в биологически активной форме в *E. coli*.

Возможность клонирования гена(ов) токсинообразования была продемонстрирована французскими авторами [19], однако в отличие от Шнепфа и Уайтли они показали, что гены токсинообразования могут иметь как плазмидную, так и хромосомную локализацию. Анализируя банк генов *Bac. thuringiensis*, клонированных в штамме *E. coli* SK1592 с применением в качестве клонирующего вектора плазмиды pBR322, им удалось идентифицировать клоны с гибридными плазмидами, несущими «споруляционные» гены, т. е. гены, транскрибируемые на стадии споруляции. Эти клоны содержали плазмиды со встроенными фрагментами ДНК, транскрипция которых начиналась в первые часы споруляции.

Использовалась тотальная ДНК *Bac. thuringiensis*, содержащая как хромосомную, так и плазмидную ДНК. Методом «nick»-трансляции было показано, что плазида из клона BT15-88 (pBT15-88) гибридизируется с 26S и РНК, способной кодировать белок с ММ 150000 дальтон. Фрагмент размером 4 килобазы, полученный при рестрикции плазмиды pBT15-88 эндонуклеазой EcoRI, содержит генетический детерминант инсектицидного токсина. Особенно интересно, что в штаммах серотипов *berliner* 1715 и *subtoxicus* ген токсинообразования локализован как в хромосоме, так и на больших (40—60 мегадальтон) плазидах. В то же время для штаммов ряда других серотипов была продемонстрирована либо только плазмидная, либо хромосомная локализация детерминант токсинообразования.

Хотя в настоящее время трудно оценить прикладное значение клонирования гена токсинообразования в клетках *E. coli* и *Bac. thuringiensis* (инсектицидная активность экстрактов из клонов в 10—50 раз ниже, чем экстрактов из *Bac. thuringiensis*), возникает ряд технологических и социальных проблем применения подобных инсектицидов, тем не менее этот успех весьма впечатляет, поскольку удалось клонировать ген, определяющий синтез специфического белка, и показать аналогичность механизмов контроля транскрипции генетического материала в *Bac. thuringiensis* и *Bac. subtilis*.

ВНИИ Генетика, г. Москва

Поступило 10.I 1983 г.

ԷՆՏՈՄՊԱԹՈԳԵՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՌԻՍՈՒՄԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ

Ռ. Ռ. ԱԶԻԶԵԿՅԱՆ

Ուսումնասիրված է *Bac. thuringiensis* տեսակի տարբեր սերոտիպերի շտամների գենետիկական բնութագիրը: Քննարկված են ընդհանուր տրանսդուկցիան, պրոտոպլաստների պլազմիդային տրանսֆորմացիան, պրոտոպլաստների միաձուլումը, պլազմիդները և ինսեկտիցիդ սպիտակուցային թույնի սինթեզի գենետիկական դետերմինանտների վեգետատիվ բազմացումը:

GENETIC ASPECTS OF THE STUDY OF ENTOMOPATHOGENOUS BACTERIA

R. R. AZIZBEKYAN

The data on genetic characterization of strains of different *Bac. thuringiensis* serotypes are represented.

The problems of transduction, protoplast fusion, plasmid transformation, cloning of genetic determinants of toxin formation in heterologic systems are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азизбекян Р. Р., Белых Р. А., Генетика, 17, 11, 1936, 1981.
2. Азизбекян Р. Р., Белых Р. А., Степанова Т. В. Докл. АН СССР, 262, 1, 226, 1982.
3. Алешкин Г. И., Бурцева Л. И., Скавронская А. Г. Генетика, 15, 1186, 1979.
4. Африкян Э. Г. Успехи микробиологии, 10, 142, 1975.
5. Белых Р. А., Смирнова Т. А., Степанова Т. В., Азизбекян Р. Р. Микробиология, 51, 3, 490, 1982.

6. Галушка Ф. П., Азизбеян Р. Р. Докл. АН СССР, 236, 1233, 1977.
7. Григорьева Т. М., Азизбеян Р. Р. Генетика, 16, 1786, 1980.
8. Дебабов В. Г., Азизбеян Р. Р., Хлебалина О. И., Дьяченко В. В., Галушка Ф. П., Белых Р. А. Генетика, 13, 3, 496, 1977.
9. Захарян Р. А., Израелян Ю. А., Агабальян А. С., Татевосян П. Е., Акопян С. М., Африкян Э. К. Микробиология, 48, 226, 1979.
10. Погосбекова М. Р., Азизбеян Р. Р. Генетика, 17, 609, 1981.
11. Рябченко И. Ф., Буканов Н. О., Саканян В. А., Алиханян С. И. Докл. АН СССР, 253, 729, 1980.
12. Azizbekyan R. R., Belych R. A., Stepanova T. V. Abstr. IV Genetics of Indust. Microorganisms, Kyoto, 55, 1982.
13. Azizbekyan R. R., Grigoreva T. M. Abstr. XII Internatl. Congr. Microbiol., Boston, 81, 1982.
14. Barjac de H. C. Acad. Sci., 270D, 2227, 1970.
15. Gonzales J., Carlton B. Plasmid, 3, 92, 1980.
16. Gonzales J., Dulmage H., Carlton B. Plasmid, 5, 351, 1981.
17. Faust R., Spizizen J., Gage V., Travers R. J. Invertebr. Pathol., 33, 233, 1979.
18. Itzuka T., Faust R., Travers R. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 60, 143, 1981.
19. Klier A., Fargette F., Ribier J., Rapoport G. The EMBO Journal, 1, 791, 1982.
20. Landen R., Heirson A., Boman H. J. Gen. Microbiol., 123, 49, 1981.
21. Lecadet M.-M., Blondel M., Ribier J. J. Gen. Microbiol., 121, 203, 1980.
22. Lereclus D., Lecadet M.-M., Ribier J., Dondor R. Mol. Gen. Genetics, 186, 391, 1982.
23. Martin Ph., Lohr J., Dean D. J. Bacteriol., 145, 980, 1981.
24. Mileva V., Shivarova N., Grigorova R. FEMS Microbiol. Lett., 12, 253, 1981.
25. Perlak F., Mendelsohn C., Thorne C. J. Bacteriol., 140, 699, 1979.
26. Sneyd E., Whiteley E. Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 5, 2893, 1981.
27. Stahly E., Dingman D., Bulla L., Aronson A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 84, 581, 1978.
28. Stahly E., Dingman D., Irgens R., Field C., Peiss M., Smith G. FEMS Microbiol. Lett., 3, 139, 1978.
29. Thorne C. Appl. Environm. Microbiol., 35, 1103, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 3, 1983,

УДК 577.159

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ИОНОВ МЕДИ С АМФОЛИНАМИ

М. А. СИМОНЯН, А. Т. МИРЗОЯН, Р. М. НАЛБАНДЯН

Инкубация супероксиддисмутаза из эритроцитов с амфолинами приводит к заметной инактивации ее, в результате присоединения к меди, и к хелации. Показано образование комплексов меди с амфолинами, характеризующихся полосами поглощения при 280 и 680 нм, причем полоса в УФ области обладает высоким коэффициентом экстинкции, сопоставимым с таковым ароматических аминокислот в белках.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, ионы меди, амфолины.

В последнее десятилетие широкое распространение получил метод изoeлектрического фокусирования, используемый для препаративных