

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохин П. К. Физiol. ж. СССР им. И. М. Сеченова, 50, 7, 773—778, М., 1964
2. Бианки В. Л., Макарова И. А., Афанасьева С. В. Ж. эвол. биохим. и физиол., 27, 5, 466—474, Л., 1986.
3. Бианки В. Л., Макарова И. А., Шрамм Е. А. Ж. эвол. биохимии и физиол., 3, 286—288, Л., 1982.
4. Гаспарян Л. А., Восканян Р. М. В сб.: «Центральные механизмы компенсаторного восстановления функций», 60—64, Ереван, 1983.
5. Гаспарян Л. А., Восканян Р. М. Ж. эвол. биохимии и физиол., 23, 2, 224—229, Л., 1987.
6. Максимов Е. В. Функциональное созревание неокортекста в пренатальном онтогенезе, М., 1979.
7. Урганджян Т. Г., Гаспарян Л. А. Третий съезд Арм. физиол. общества, доклады, 176—180, Ереван, 1979.
8. Grafstein K. J. Neurophysiol., 22, 5, 504—515, 1959.
9. Grafstein B. J. Neurophysiol., 26, 1, 77—99, 1963.
10. Purpura D. P., Carmichael M., Novakovic E. M. J. Exp. Neurol., 2, 4, 324—347, 1960.
11. Shofar P. J., Purpura D. P. J. Exp. Neurol., 37, 2, 441—445, 1972.
12. Wilson D. A., Reelin N. J. Development Biol. Res., 7, 2—3, 272—276, 1983.

Поступило 10.VII.1990

Биолог. журн. Армении, № 10—11.(43).1990

УДК 677.323.01

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК САЛЬМОНЕЛЬНЫХ ФАГОВ

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, А. С. САФАРЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван.

Показано, что молекулярные массы ДНК сальмонельных фагов—умеренно-вирулентного dp8 и умеренных dp9 и P22—находятся в пределах $(25—30) \times 10^6$ Дальтон. Установлено также наличие концевых повторов и циркулярной пермутации молекул ДНК. В гетеродуплексах найдена значительная степень гомологии, особенно для ДНК dp9 и P22. Обсуждаются особенности неровных структур, полученных на основе анализа дифференциальных кривых плавления. Физико-химические характеристики ДНК коррелируют с генетическими свойствами изучаемых фагов.

Զափափոր փրոպեյնս ը ը 8 և չափափոր ը ը 9 ու P—22 ֆագերի ԴՆԹ-ն բնութագրվի է հալման կորերի նուրբ կառուցվածքի, դուրանայ հատվածների պահի-ֆիկ ֆրագմենտացիայի, էլեկտրոնային մանրադիտակի, ուստրիկցիայի, ասեդի-մենտացիայի արագության մեթոդներով: Տարբեր՝ միմյանցից անկախ մեթոդներով որոշված ընդ որ ֆագերի ԴՆԹ-ի մոլեկուլային զանգվածը համապատասխանում է $25—30 \times 10^6$ զանգվածի:

Համոդուպլեքսային անալիզի մեթոդով ցույց է տրված ԴՆԹ-ի մոլեկուլների քրոմոցիդիկոլար պերմուտացիան և ձալույնի կրկնությունների առկայությունը, իսկ հետերոդուպլեքսային եղանակով գտնված է զգալի հոմոլոգիա, հատկապես dp9 և P22 ֆագերի ԴՆԹ-ի միջև: Հալման տարբերակիչ (դիֆերենցիալ) կորերը նույնպես վկայում են այդ ֆագերի ԴՆԹ-ի նմանության մասին:

Հաթի է նշել, որ ԴՆԹ-ների ֆիզիկա-քիմիական բնութագիրը համընկնում է սալմոնելարիկ ֆագերի գենետիկական հատկանիշներին:

Two Salmonella phages DNA properties have been studied—moderate virulent phage dp8 and temperate ones dp9 and 22—by means of fine electronic microscope, restriction analysis and velocity sedimentation techniques.

Сокращения ДКП—дифференциальные кривые плавления, SSC—0,15 М, NaCl 0,015 М Na нитрат.

Using different independent techniques the determined molecular masses of three phages DNA coincide being equal to $25-30 \cdot 10^6$ Daltons. Due to heteroduplex analysis the terminal repeats and circular permutation of DNA molecules were found. A considerable degree of homology was discovered especially for ϕ p9 and P22 DNAs. The melting differential curves of ϕ p9 and P22 DNAs are significantly related too. The obtained physico-chemical characteristics of DNAs are correlated with the genetic properties data of studied phages.

Фиги сальмонелльные—ДНК.

Интерес к изучению молекулярной организации сальмонелльных фагов и P22 [6, 7, 8] обусловлен широким распространением инфекционных заболеваний сальмонеллезной этиологии и связанной с этим необходимостью создания новых эффективных лечебных антибактериальных препаратов. В указанном аспекте представляло интерес сравнительное изучение физико-химических характеристик ДНК и сопоставление полученных результатов с данными о генетических свойствах этих фагов. Для решения этой задачи были проведены рестрикционный анализ ДНК фагов ϕ p8, ϕ p9, электронномикроскопическое исследование гомо- и гетеродуплексов ДНК, а также сравнительный анализ особенностей первичных структур ДНК этих фагов и фага P22.

Материал и методика. Фаголизаты получали методом агаровых слоев по Грациа, фаговые ДНК выделяли по методу Мак-Хетче. Содержание белка в препарате ДНК, определенное по Лоури, составило 1%. Среднемассовую молекулярную массу (M_w) ДНК определяли по методу скоростной седиментации в растворе 1XSSC. Ферменты рестрикции EcoR I, Sal I, Hpa I, BamH I, Kpn I выделяли в лаборатории биокатализа ИМБ АН СССР из соответствующих штаммов. Гетеродуплексы получали по известному методу Девиса [7]. В качестве внутреннего стандарта длины использовали плазмиду Col E1 с известной молекулярной массой ($4.4 \cdot 10^6$ D). Методики плавления ДНК, получения дифференциальных кривых плавления, их обработки, а также специфической фрагментации ДНК по легкоплавким участкам описаны ранее [3-5].

Результаты и обсуждение. Все ДНК имеют среднемассовую молекулярную массу $(25 \pm 30) \cdot 10^6$ Дальтон. В качестве примера на рис. 1 приведена седиментограмма ДНК фага ϕ p8, молекулярная масса которой, вычисленная по Фрайфельдору, равна $(27 \pm 1.2) \cdot 10^6$ Дальтон. Представлены также электронные микрофотографии гомодуплексов молекул ДНК фагов ϕ p8, ϕ p9 и P22 (рис. 2-4). Появление кольцевых структур с однонитевыми отростками свидетельствует о циркулярной пермутации молекул и наличии концевых повторов [10]. Отростки, оставшиеся вне двунитового кольца, представляют собой концевые повторы. Из таблицы видно, что кольцевые молекулы (собственно геномы) короче линейных на величину концевого повтора (в пределах точности измерения).

Величины контурных длин линейных молекул согласуются со значениями, полученными седиментационным методом. Как видно из таблицы, размеры ДНК и концевого повтора фагов ϕ p9 и P22 близки. Концевой повтор фага ϕ p8 несколько больше (составляет 4,4% генома). Расстояние между выступающими концами зависит от величины отрез-

ка, подвергнутого циклической перестановке (пермутации). Степень пермутации определяется как отношение максимального расстояния между отростками ко всей длине этого кольца [12]. Как видно из гисто-

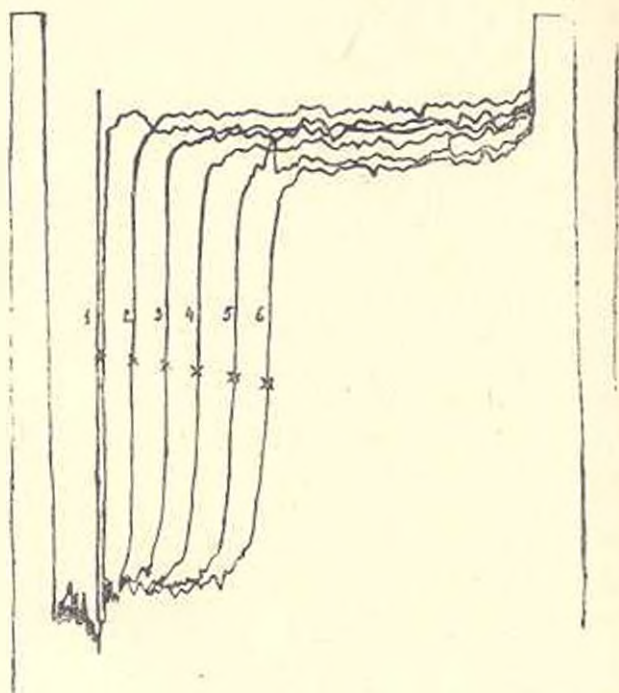


Рис. 1. Гистогрaммa скорости оседания ДНК фага T_4 в $CsCl$. Скорость оседания радиостационарной гравитации фиксирована при $\omega = 250$ об/мин. Цифры на кривых относятся к различным моментам времени ($\Delta t = 32$).



Рис. 2. Электронномикроскопическая фотография гомодуплекса ДНК T_4 .

Параметры гомодуплексов ДНК dp8, dp9, P22

ДНК	Число измерений	Длина линейных молекул, мД	Длина кочевых молекул, мД	Величина концевых повторов
dp8, dp8	23	$27,3 \pm 1,2$	$26,1 \pm 0,9$	$1,14 \pm 0,16$ (4,1%)
P22, P22	20	$27,1 \pm 1,7$	$26,6 \pm 1,4$	$0,54 \pm 0,05$ (2%)
dp9, dp9	18	$27,3 \pm 1,3$	$26,5 \pm 0,7$	$0,66 \pm 0,1$ (2,5%)

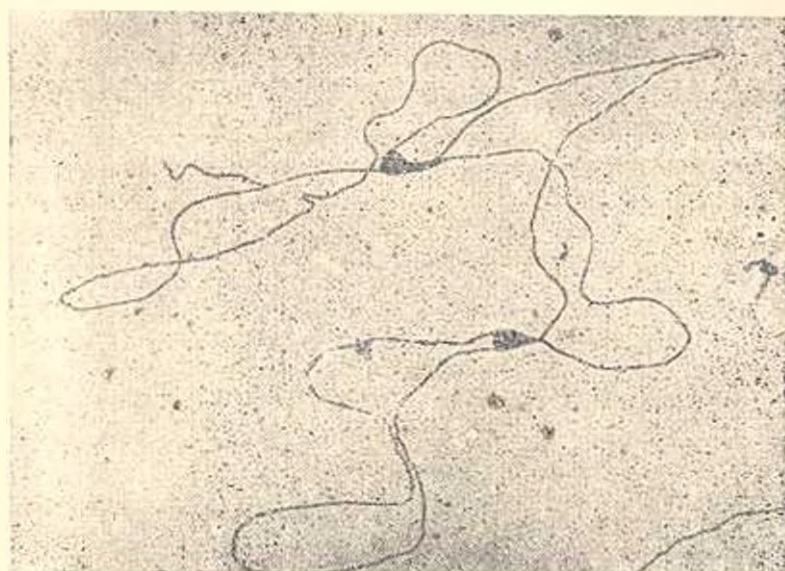


Рис. 3. Электронно-микроскопическая фотография гомодуплексов ДНК dp8.

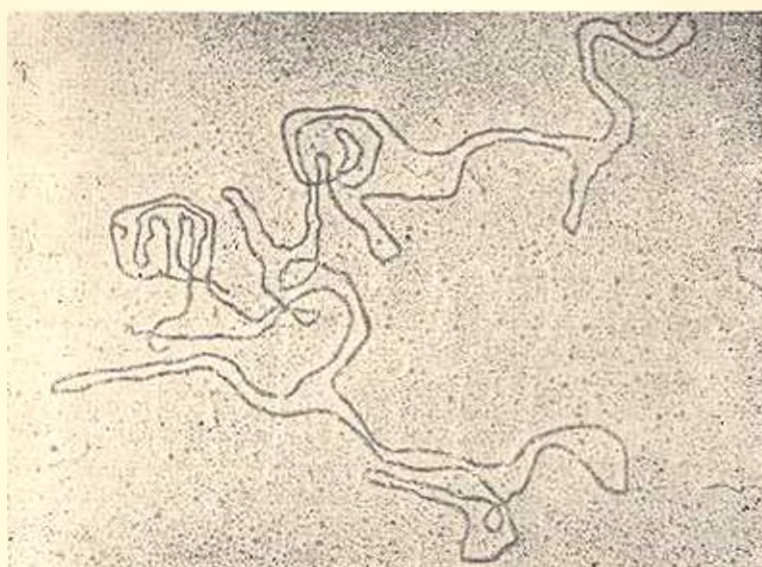


Рис. 4. Электронно-микроскопическая фотография гомодуплексов ДНК P22.

грамм (рис. 5). распределение величин отношений максимального расстояния к длине всей кольцевой молекулы не является случайным. Так, для ДНК фага P22 в 91% случаев эта величина находится в пределах $0,82 \div 1$. Это означает, что степень пермутации составляет 18%, что согласуется с литературными данными. Для ДНК фага $\phi r9$ в 88,5% случаев эта величина составляет $0,8 \div 1$, что соответствует степени пермутации 20%. Для ДНК $\phi r8$ в 89,5% случаев она составляет $0,84 \pm 1$, что соответствует степени пермутации 16%.

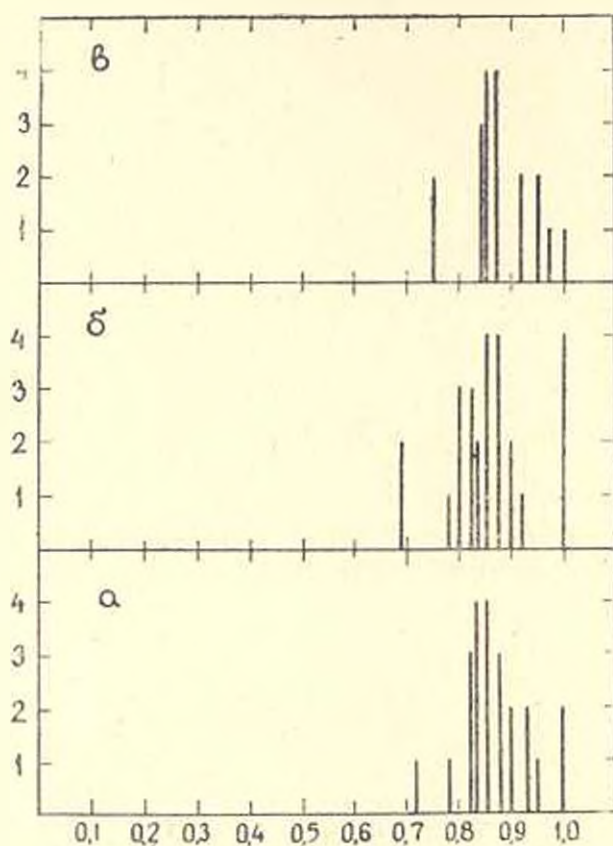


Рис. 5 Гистограммы распределения отношений больших расстояний между однонитевыми отрезками в гомодуплексах к длине данных колец. По оси абсцисс — относительная длина расстояний, по оси ординат — число молекул: а) ДНК P22, б) ДНК $\phi r9$, в) ДНК $\phi r8$.

На рис. 6, 7 приведены электронные микрофотографии гетеродуплексов $\phi r8/P22$ и $\phi r9/P22$. Между ДНК фагов $\phi r9$ и P22 выявлена значительная ($92 \pm 0,6\%$) гомология. На рис. 6 видна непрерывная двухцепочечная структура гетеродуплекса с непрерывными однонитевыми участками, обусловленными неполной гомологией, которые локализованы преимущественно в середине линейной структуры гетеродуплекса. Различия между ДНК $\phi r8$ и P22 более существенны (рис. 7). Негомология составляет до $22,6 \pm 1,7\%$. Неспаренные участки локализованы исключительно в одной половине гетеродуплекса.

Таким образом, по данным электронной микроскопии так же, как и по результатам генетического исследования [1], между ДНК ϕ r9 и P22 имеется значительная гомология. Поскольку P22 относится к группе ламбдоидных фагов, то ϕ r9 также следует отнести к этой группе.



Рис. 6. Электронная микрофотография гетеродуплексов ДНК ϕ r8/P22.



Рис. 7. Электронная микрофотография гетеродуплексов ДНК ϕ r9/P22.

Результаты рестрикции ДНК фагов ϕ r8 и ϕ r9 сопоставлены с картиной рестрикции ДНК P22, известной из литературы [9, 11]. ДНК фага ϕ r8 расщепляется эндонуклеазой EcoRI на 5 относительно крупных фрагментов. Эндонуклеазы BamHI, SalI, KpnI не имеют сайтов рестрикции на ДНК ϕ r8.

Наибольшее число фрагментов образуется при действии рестриктазы HpaI. Фрагменты эти находятся в области молекулярных масс от $0,4 \times 10^6$ до $10,5 \times 10^6$ Дальтон. Отметим, что 7 полос, соответствующих фрагментам рестрикции ДНК ϕ r8 и ϕ r9 эндонуклеазой HpaI, идентичны, а 4 полосы различаются. Эндонуклеаза BamHI имеет на ДНК ϕ r9 5 сайтов рестрикции; EcoRI—7 сайтов рестрикции на ДНК ϕ r9, аналогично ДНК P22, хотя и с несколько иным распределением полученных фрагментов по молекулярным массам.

Известно, что в случае пермутированных молекул с концевой избыточностью рестрикционный анализ не позволяет однозначно оценивать молекулярную массу ДНК фага по сумме молекулярных масс отдельных фрагментов, что связано с вероятностным содержанием отдельных фрагментов в популяции молекул. Тем не менее оценка суммарной молекулярной массы всех фрагментов расщепления эндонуклеазами рестрик-

ции ДНК ϕ р8 и ϕ р9 дает величины, согласующиеся со значениями молекулярных масс ДНК, полученными методами седиментации и электронной микроскопии.

Как известно, тонкая структура ДКП показывает особенности распределения пар оснований в структуре генома. В работах [3, 4] приведены ДКП ДНК фагов ϕ р8, ϕ р9 и P22 и проведен подробный сравнительный анализ пиков на ДКП, отражающих особенности первичных структур различных ДНК. Так, найдено, что величина ширины интервала плавления ДНК ϕ р8 ($\Delta T = 6^\circ$) является промежуточной между значением ΔT для ДНК вирулентных фагов ($\sim 3^\circ$) и таковой для ДНК умеренных фагов (10°), что позволяет охарактеризовать фag ϕ р8 как полуумеренный или умеренно-вирулентный [3]. Этот вывод согласуется с данными по лизогенизации своего хозяина K 89 *S. derby*, при которой наблюдается обратная зависимость: при увеличении множественности инфекции процент лизогенных бактерий уменьшается. Умеренно-вирулентный характер фага ϕ р8 проявляется также в характере негативных колоний, низких частотах лизогенизации и трансдукции и необычайно высокой величине спонтанной и УФ-индукции.

Между первичными структурами ДНК ϕ р8 и ϕ р9 имеются существенные различия. Эти различия согласуются с показанной ранее [2] разницей между фагами ϕ р9 и ϕ р8: в морфологии фagовой частицы, характере негативной колонии, различных константах тепловой инактивации.

Величины T_m плавления и ширина интервала плавления ДНК ϕ р9 и P22 характерны для ДНК умеренных фагов. В самом деле, истинно умеренный характер фага ϕ р9 проявляется прежде всего в характере негативной колонии, образуемой им на газоне хозяина LT2 *S. typhimurium*, а также в прямой зависимости процента образования лизогенных бактерий от множественности инфекции. Между кривыми плавления ДНК фагов ϕ р9 и P22, имеющих одного бактериального хозяина *S. typhimurium* и серологическое родство, имеется значительное сходство [4]. У ДНК ϕ р9 и P22 совпадают ГЦ-содержание и ширина интервала плавления. Совпадают также молекулярные массы этих ДНК. Анализ ДКП ДНК близкородственных фагов ϕ р9 и P22 с применением методики фиксации расплавленных участков глюкозием с последующим разрезанием их посредством нуклеазы S1 позволил обнаружить и выделить в составе ДНК этих фагов 3 одинаковые, обогащенные АТ-парами (63%) последовательности по 400 пар нуклеотидов каждая.

Были оценены молекулярные массы двуспиральных участков ДНК, оставшихся после гидролиза расплавленных участков [3, 4].

Оказалось, что эти двуспиральные участки ДНК ϕ р9 и P22 (которые соответствуют правые части ДКП) различны. Следовательно, ДНК ϕ р9 и P22 отличаются распределением по блокам участков, богатых ГЦ-парами.

Таким образом, различия между этими фагами (морфология негативной колонии, цикл одиночного развития и выход фага), проявляясь на уровне первичной структуры их ДНК, отражаются в ДКП.

В последнее время получено множество данных, свидетельствующих о том, что функционально значимые участки ДНК находятся в областях,

богатых АТ-парами, что облегчает образование открытого комплекса [4, 13]. Это было показано электронномикроскопическим методом картирования областей частичной денатурации на примере ДНК λ , ДНК колифага M13, фагов d29 и T7. Необходимо, однако, отметить, что высокое АТ-содержание — необходимый, но не достаточный признак специфического сайта. Возможно, в ДНК изученных умеренных фагов выявленные блоки АТ-богатых участков ответственны за процесс интеграции-экзциации.

Авторы выражают благодарность Ю. С. Лазуркину, Ю. Л. Любченко, В. Г. Степанову за содействие в выполнении настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартанян М. К., Карибеков Б. П. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 97—99, Ереван, 1970.
2. Вартанян М. К., Кцоян Ж. А., Карибеков Б. П. Биолог. журн. Армении, 30, 9, 14—19, 1977; 31, 1, 8—12, 1978.
3. Габриелян А. Г., Аблязимова Н. А., Вартанян М. К., Карагезян К. С., Захарян Э. Г. Биолог. журн. Армении, 33, 8, 799—803, 1980.
4. Габриелян А. Г., Сафарян Э. С., Сафарян А. С., Вартанян М. К., Захарян Р. А. Биолог. журн. Армении, 34, 6, 627—632, 1981.
5. Захарян Р. А., Сафарян А. С., Захарян Э. Г., Сафарян В. С., Карагезян К. С., Носиков В. В. Докл. АН АрмССР, 66, 5, 296—301, 1978.
6. Bazinet G., King J., Benbasat J. Biochemistry, 27, 1849—1856, 1988.
7. Davis R. V., Davidson N. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 60, 243—251, 1968.
8. Fuller M. F., King J. I. Mol. Biol., 126, 633—663, 1975.
9. Jaeson E. N., Miller H. J., Adams M. L. J. Mol. Biol., 118, 3, 347—363, 1978.
10. Lee C. S., Davis R. W., Davidson N. J. Mol. Biol., 18, 1, 1970.
11. Ruzila I. E., Jaeson E. N. Virology, 113, 703—775, 1981.
12. Tye B. R., Chen R. K., Botstein D. J. Mol. Biol., 123, 485, 1974.
13. Vollenweider H. J., Szybalski W. J. Mol. Biol., 123, 485, 1978.

Поступило 20.VII 1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 10—11 (43) 1990

УДК 577.352.315

ТРАНСПОРТ КАТИОНОВ У СТРЕПТОМИЦИНУСТОЙЧИВЫХ МУТАНТОВ *E. COLI*

А. А. ТРЧУНЯН, Э. Т. МУГНЕЦЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики,
проблемная лаборатория цитогенетики

Скорость выхода K^+ из стрептомицинустойчивых клеток *E. coli* с мутацией по RPSL локусу хромосом в среде без экзогенного источника энергии значительно выше, чем из клеток дикого типа. Мутанты в среде с глюкозой осуществляют обмен H^+ клетки на K^+ среды со стехиометрией ДЦКД-чувствительных потоков катионов, равной $2H^+/K^+$. Они поддерживают высокий мембранный потенциал ($\Delta\psi$) и создают распределение K^+ между клеткой и средой, превышающее 10^3 . Однако обмен $2H^+/K^+$ теряет осмочувствительность. Предполагается, что развитие устойчивости к стрепто-

Сокращения: ДЦКД — дициклогексилкарбодимид.