ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ТРАНСЛОМНЫХ ПНК *BACILLUS THURINGIENSIS*

В. А. ЧИГЧАН, И. С. АМЛАНИМЯН, Ж. И. АКОПЯН, Э. К. АФРИКЯН

Институт биологических наук НАН Армении, Ереван
Институт селекции растений НАН Армении, Ереван

Анализ структурно-функциональных ПНК рибосомной субъединицы *Bacillus thuringiensis* проводился с помощью содержания плазмидной ДНК в штаммах *B. thuringiensis* с различными типами транслонных молекул. Анализ проводился с помощью метода электрофореза в полиакриламидном геле.

Abstract. The structure and function of the translocon PNC of the ribosomal subunit of *Bacillus thuringiensis* was studied by the content of plasmid DNA in strains of *B. thuringiensis* with different types of translocon molecules. The analysis was carried out by the method of electrophoresis in polyacrylamide gel.

The content of plasmid DNA of the different cultures of *Bacillus thuringiensis* was analyzed by the method of electrophoresis in polyacrylamide gel. The content of plasmid DNA for *Bacillus thuringiensis* with different types of translocon molecules was determined.

Ученые считают, что высокая активность применены в сельском хозяйстве. Изучение механизма действия бактерий, обладающих способностью к образованию биотоксинов. В ряду этих бактерий выделяются *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus spizizenii* и *Bacillus pumilus*. Исследованиями японских ученых [15] установлено, что у *B. thuringiensis* выделяется два типа транслонных молекул [1, 13]. В большинстве случаев они имеют высокую активность в составе высокомолекулярной плазмиды синаптической группы транслонных [4, 11]. Поэтому изучение взаимодействия сложной у высокомолекулярной бактерий представляет нам достаточно актуальную проблему. Исследования в этой области были проведены только в Европе [1, 13, 17]. Надо отметить, что плазмиды у штаммов различных возбудителей *B. thuringiensis* имеют различия между собой [11].

Целью настоящего исследования является изучение и характеристика транслонных молекул новых штаммов *B. thuringiensis*.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *B. thuringiensis*, выделенные из насекомых-вредителей и дефицитные в коллекции микроорганизмов Института селекции растений Национальной академии наук Армении (акроним-ИНСА).

Таким образом, в работе использованы штаммы *B. thuringiensis*, которые не имеют транслонных молекул. В коллекции ИНСА имеются штаммы 1093 - серотип 3; 2002 - серотип 4; 1000 - серотип 5; 2275 - серотип 10; 2470 - серотип 15; 2471 - серотип 16; 2472 - серотип 17; 2473 - серотип 18; 2774 - серотип 19 и 14 оригинальных штаммов *B. thuringiensis*, которые не имеют транслонных молекул. 23 штамма подцели (серотипов) данных штаммов. Эти штаммы использованы в коллекции ИНСА под номерами 131с, 132, 151, 164, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2367, 2368, 2378, 2393, 2397. Все они имеют характерные для *B. thuringiensis* ромбовидные споры с характерными хвостиками.

Культуры *B. thuringiensis* выращивали на мясопептонном (МПА) и рыбном (РБ) бульонах в других питательных средах с большой аэрацией. Колонии деловито-крючковатые, белые, сероватые, не растекающиеся в среду. Характерные клетки

названиями, полигонале. Аэробы, граммоложные или (Метерка) неполовые амфилиптические и протеолитические свойствам. Морфология типичная, особенности изучены культур *B. thuringiensis* сопоставляем с описаниям в научных определениях [3, 9].

Культуры бактерий выращивать в глубинных условиях в количествах 10 мл (250 мл) на 25 мл на рыбном бульоне следующего состава (1/1): гидролизат рыбной - 20,0, сернокислый марганец - 0,002, вода водопроводная - до 1 литра, конечный pH среды 7,2. Штаммы культивировали на эритроцитарной среде (250 об/мл) при 30° в течение 16 ч для выделения плазмидной ДНК по известному методу [10] с модификациями, предложенным ранее [11].

Для выделения плазмидной ДНК для определения их относительной подвижности и молекулярной массы проводили электрофорез в 0,7% агарозном геле (18 × 19 × 0,5 см) в буфере: 40 mM триэтанол, 5 mM ацетат натрия и 1 mM ДЦТА, pH 7,4, в течение 16 ч при 30 вольт/см. После окрашивания геля этидиб бромидом (0,5 мкг/мл) молекулы ДНК визуализировали по их свечению в ультрафиолетовом свете. Подвижность плазмидных и их родительскую геномную массу определяли по их относительную относительную маркерных молекул с известными молекулярными массами. При расчетной экстракции определяли как супердискриптованные так и кольцевые формы плазмид. Дифференцирование этих форм проводили по величине и относительной относительной подвижности супердискриптованных и кольцевых форм ряда маркерных молекул.

Результаты и обсуждение. Полученные данные мы обобщили в виде таблицы, из которой видно, что исследованные штаммы *B. thuringiensis* содержат плазмиды, количество и молекулярная масса которых варьирует в зависимости от штамма. В некоторых случаях удается выявить также и низкомолекулярные плазмиды. Что касается функции выделенных плазмид, то известно, что одна из высокомолекулярных плазмид содержит ген кристаллического токсина. Все эти плазмиды варьируют в зависимости от серотипа. Относительно функции низкомолекулярных плазмид было высказано предположение, что они принимают участие в регуляции биосинтеза токсина [14]. Обнаружены также локализованные гены устойчивости к тетрациклину на плазмиде 5,2 МД в *B. thuringiensis* var. *berliner* [3]. Однако пока неизвестно, что других сообщений не было в большинстве авторов не рассматривает низкомолекулярные плазмиды как несущие устойчивость к разным антибиотикам. В целом функции низкомолекулярных плазмид остаются критическими.

Исследованные штаммы	Количество плазмид	Молекулярные веса молекул плазмид МД
Серотипированные штаммы:		
1093 (серотип 3)	5	1,5; 2,2; 5; 6,6; 20
2002 (серотип 4)	7	3,9; 4,3; 5,9; 8,6; 9,2; 10,5; 23,1
1000 (серотип 5)	3	3,6; 4,9; 23,1
2275 (серотип 10)	7	2,5; 3; 3,6; 4,4; 6,6; 8; 13,2
2470 (серотип 15)	3	3,3; 3,96; 4,4
2471 (серотип 16)	2	3,3; 4,4
2472 (серотип 17)	3	4; 5,6; 29,7
2473 (серотип 18)	3	3,6; 5,3; 46,2
2774 (серотип 19)	3	4,6; 8,6; 26,4
Несеротипированные штаммы:		
131e	2	7,3; 30
132	2	7,3; 30
151	?	5,6; 6,6

164	7	5,6, 6,6
2290	4	6; 8,6; 14; 26,6
2293	1	6,6
2297	8	7,6; 4,4; 6,3; 16,5; 29,7
2298	4	3,6; 4,4; 13,2; 26
2299	3	6; 19; 20
2367	6	2,6; 7,3; 7,6; 9,2; 16,5; 36,3
2368	6	4; 5,2; 5,6; 7,3; 7,6; 16,5
2378	3	4,3; 16,5; 33
2393	5	3,5; 8,6; 9,2; 10,6; 15,5
2397	4	3,6; 5,3; 16,5; 30

При внимательном рассмотрении таблицы можно заметить, что плазмиды с одинаковыми молекулярными весами обнаруживаются у представителей различных серотипов. Плазида 3,6 МД встречается у штаммов 1900, 2275, 2473 и у несеротипированных штаммов 2297, 2298, 2397. Анализ плазмидных спектров несеротипированных штаммов показывает, что у штаммов 151 и 164, а также 131с и 132 плазмидные спектры идентичны в рамках используемых методов выделения плазмид. Другие штаммы, как например, 2297 и 2298, имеют частично сходные плазмидные спектры. Спектры плазмид некоторых несеротипированных штаммов имеют частичное сходство со спектрами плазмид некоторых серотипированных штаммов. Так, плазмиды 2297 и 2298 имеют спектр плазмид, частично сходный со спектром штамма 2471. Некоторое сходство наблюдается и между штаммами 2397 и 2473. Можно предположить, что плазида имеет общее происхождение и распространилась среди штаммов в результате конъюгативного переноса между серотипами. Возможность такого переноса показана в работах Чапмана [3] и Джарета [9]. Учитывая это в литературе обсуждается вопрос о серотипоспецифичности плазмидного спектра [8, 10, 15], а также опираясь на данные собственных исследований [1], можем сделать заключение о генетическом родстве штамма 2298 с серотипом 16, а штамма 2397 - с серотипом 18. Подобный вывод можно сделать и в отношении штаммов 131с и 132, а также 151 и 164, могущих быть объединенными в один и тот же серотип соответственно.

Вопрос о возможном использовании плазмидных спектров в качестве дополнительной характеристики при описании штаммов особенно интересен в отношении к виду *B. thuringiensis* [4, 8, 15], так как практически все исследованные штаммы этого вида содержат плазмиды [7, 13]. Однако к другим видам рода *Bacillus* данный подход нельзя считать приемлемым. Лонгетт и Брамунци [12] обнаруживали плазмиды всего у 2 из 18 исследованных штаммов *B. subtilis*, и у 3 из 20 штаммов *B. pumilus*. Также выявив плазмиды только у 4 из 19 исследованных штаммов *B. subtilis* [16]. 4 штамма *B. subtilis*, исследованных Нотимурой, вообще не содержали плазмид [17]. При изучении 11 серотипов *B. thuringiensis* и 6 штаммов *Bacillus cereus* Мителы [13] обнаруживали плазмиды у всех исследованных штаммов *B. thuringiensis* и только у 3 штаммов *B. cereus*. Полученные нами результаты и данные литературы подтверждают тезис о повышенном содержании плазмидосемных генетических элементов у бактерий вида *B. thuringiensis* по сравнению со всеми другими видами рода *Bacillus*.

Указанный факт обусловлен высокой биосинтетической активностью в сложном цикле клеточной дифференциации бактерий *B. thuringiensis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аубакиров И.С., Чегин В.Г., Чигиняри К.О., Меликсетян В.И., Ахонджян Н., Афруцкий Э.И. Микробиология, 56, 2, 243, 1987.
2. Vicalaini H.C., Doly J. Nuel. Acids Res., 7, 1513, 1979.
3. Charlton J.S., Carlton B.C. Plasmid Vectoria Proc. Cent. Urbana, Ill., 3, 1984.
4. Gonzalez J.M.Jr., Dalmace H.T., Carlton B.C. Plasmid, 5, 351, 1981.
5. Gibson T., Simons R.P. Bergey's Manual of Determinative Bacteriol (8th ed), Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1974.
6. Gordon R.E., Haynes N., Pang C.H.N. The Genus Bacillus. Agriculture Handbook, 427, Washington, 1973.
7. Izuka T., Casso R.M., Towers R.S. J. Scientific Ser. Japan, 50, 1-6, 1981.
8. Izuka T., Casso R.M., Towers R.S. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., vol. 2, 1981.
9. Izumi H., Stephens M. Appl. and Environ. Microbiol., 26, 6, 1025, 1978.
10. Inada P. J. MS Microbiol. Lett., 15, 25, 1987.
11. Lerechis D., Lecken A.M., Rizbi J., De-konker R. Mol. Gen. Genet. 189, 211, 1982.
12. Lovell P.S., Pringle G. J. Bacteriol., 124, 484, 1975.
13. Mitrov L.V. Dokl. Akad. Nauk, 11, 3, 1659, 1979.
14. Mitrov L.V., Gergova R. Mik. Zbl., 107, 6, 678, 1988.
15. Scheston M.C. Acta Bacteriol. and Biophys. Acad. Sci. Hung. 19, 1, 1976.
16. Tazaki T., Kuroda M., Sakihara K. J. Bacteriol., 126, 489, 1977.
17. Yashinets A., Tsamirato O., Seel T., Okhina Y. Appl. and Envir. Microbiol., 45, 6, 1755, 1983.

Получено 11.04.1992

Экзон журн. Армения 2(48), 1992

УДК 577.391.576.5.021.375.5

О РАДИОЗАЩИТНОМ ДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО

КЛИВОКАНА И МАЛФУМАНИИ

ИИО "Лазерная техника", Ереван

Обнаружено радиозащитное действие лазерного излучения с длиной волны 532 нм на клетки бактерии *Escherichia coli* K-12 при предварительном облучении ультрафиолетом. Показано, что лазерное излучение оказывает на клетки бактерий радиозащитное действие при предварительном в последующем облучениях, причем с одинаковой максимальной эффективностью при плотности энергии 11×10^3 Дж/см².

Հայաստանի ԻՖՅԸ ընդհանուր կրթության բաժանմանը ներկայացված աշխատանքը նվիրված է էսչերիչիա *Escherichia coli* K-12 բակտերիաների փոխադրված ռադիոակտիվությանը և ռադիոակտիվությանը դիմացի ռադիոապակիչ ազդեցությանը կապակցությամբ: Արդյունքում ցուցված է, որ ռադիոակտիվությանը դիմացի ռադիոապակիչ ազդեցությունը կապակցված է լազերային խողովակային ճառագայթմանը: Առավելագույն արդյունավետությունը 11×10^3 Ջ/սմ² կենդանի խողովակային դիմացի ճառագայթմանը կենդանիությունը: