

УДК 575.114.4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

В. С. Сафарян, В. Б. Мякинин,
В. В. Носиков, А. И. Степанов

Рестрикционная карта плазмиды RP4

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 25/IX 1979)

Детальный рестрикционный анализ конъюгативного фактора лекарственной устойчивости RP4, обладающего уникальной способностью стабильно наследоваться во многих видах бактерий, представляет важное значение как для исследования ее необычных систем репликации и конъюгации, так и для создания векторных молекул ДНК с широким спектром действия. Ранее нами были определены участки узнавания на ДНК RP4 для рестриктаз Sall, BamHI и SmaI (¹).

В настоящей работе приводится рестрикционная карта плазмиды RP4, которая может быть использована для осуществления экспериментов по клонированию различных районов ее ДНК.

В основу построения рестрикционной карты RP4 положены результаты двойного расщепления ДНК плазмиды различными эндонуклеазами.

Рестриктазы выделяли по методам HindIII, EcoRI (²); BamHI (³); Sall (⁴), HpaI, PstI (¹). Рестриктаза SmaI любезно предоставлена Р. Беляевой. ДНК плазмиды RP4 выделяли по методу (⁵). ДНК фага λc185s7 была любезно предоставлена Р. М. Крюковым. Условия расщепления ДНК RP4 и фага λ изложены в работе (¹). Обработку ДНК плазмиды эндонуклеазой PstI проводили следующим образом: 90 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, рН 7.4; t — 37°C.

Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в 0,8—1,0%-ном агарозном геле («Sigma») при 2—5 в/см. Определение размеров фрагментов проводили по их подвижности в агарозном геле при электрофорезе. В качестве стандартов использовали фрагменты, образующиеся при расщеплении ДНК фага λ рестриктазами EcoRI, HpaI, SmaI, HindIII и KpnI.

При построении физической карты плазмиды RP4 за точку отчета был принят единственный участок узнавания рестриктазы EcoRI. Рестриктазы HindIII и HpaI также имеют по одному участку узнавания на ДНК плазмиды RP4. Двойное расщепление ДНК RP4 рестрик-

тазами *EcoRI*+*HindIII* и *EcoRI*+*HpaI* (рис. 1) не позволяло установить ориентацию участков по отношению к участку расщепления ДНК RP4 рестриктазой *EcoRI*. Поэтому было проведено двойное расщепление ДНК RP4 рестриктазами *Sall*+*HpaI* и *Sall*+*HindIII*. При этом исчезает большой фрагмент S—A и образуются новые фрагменты SH—A1, A2 и SHp—A1, A2 (рис. 1), что указывает на наличие участков узнавания рестриктаз *HindIII* и *HpaI* внутри фрагмента S—A. Размеры всех этих фрагментов приведены в таблице, а положение участков узнавания рестриктаз *HindIII* и *HpaI* на ДНК RP4 показано на рис. 3.

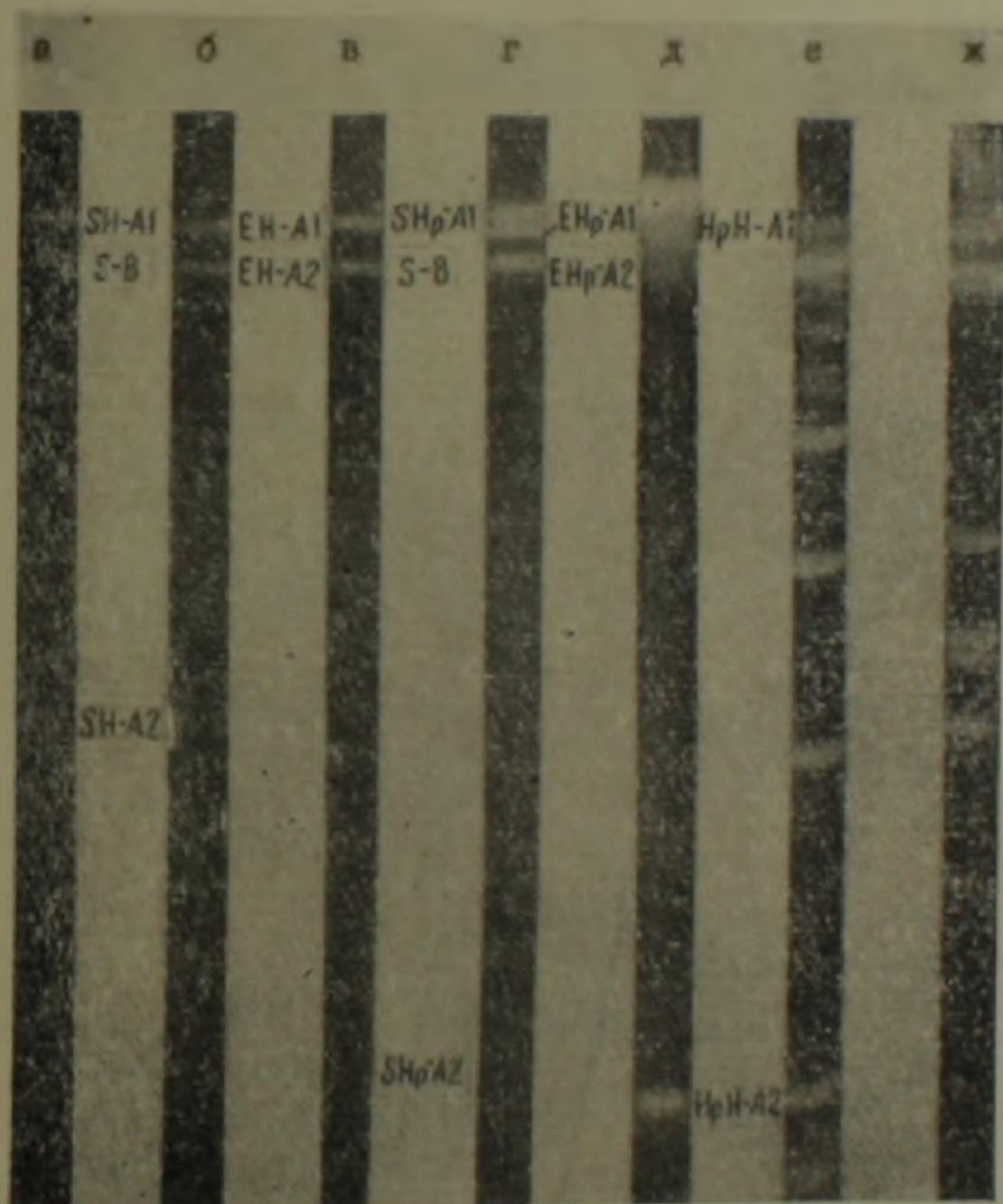


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК плазмиды RP4, образующихся при действии рестриктаз: а—*Sall*+*HindIII*; б—*EcoRI*+*HindIII*; в—*Sall*+*HpaI*; г—*EcoRI*+*HpaI*; д—*HpaI*+*HindIII*; е—ДНК фага λ +*HindIII*; ж—ДНК фага λ +*HpaI*.

При расщеплении ДНК плазмиды RP4 рестриктазой *Pst*I образуется шесть фрагментов с молекулярным весом от 0,45 до 17,58 МД (таблица). В таблице и на рис. 2 приведены результаты совместного расщепления ДНК RP4 рестриктазой *Pst*I с рестриктазами *EcoRI*, *Bam*HI и *Sall*. Как видно из рис. 2, участки узнавания рестриктаз *EcoRI*, *Bam*HI и *Sall* расположены в фрагментах P—A, P—D и P—B, C соответственно. На основании этих данных можно установить взаимное положение 4 из 6 фрагментов, образующихся при действии

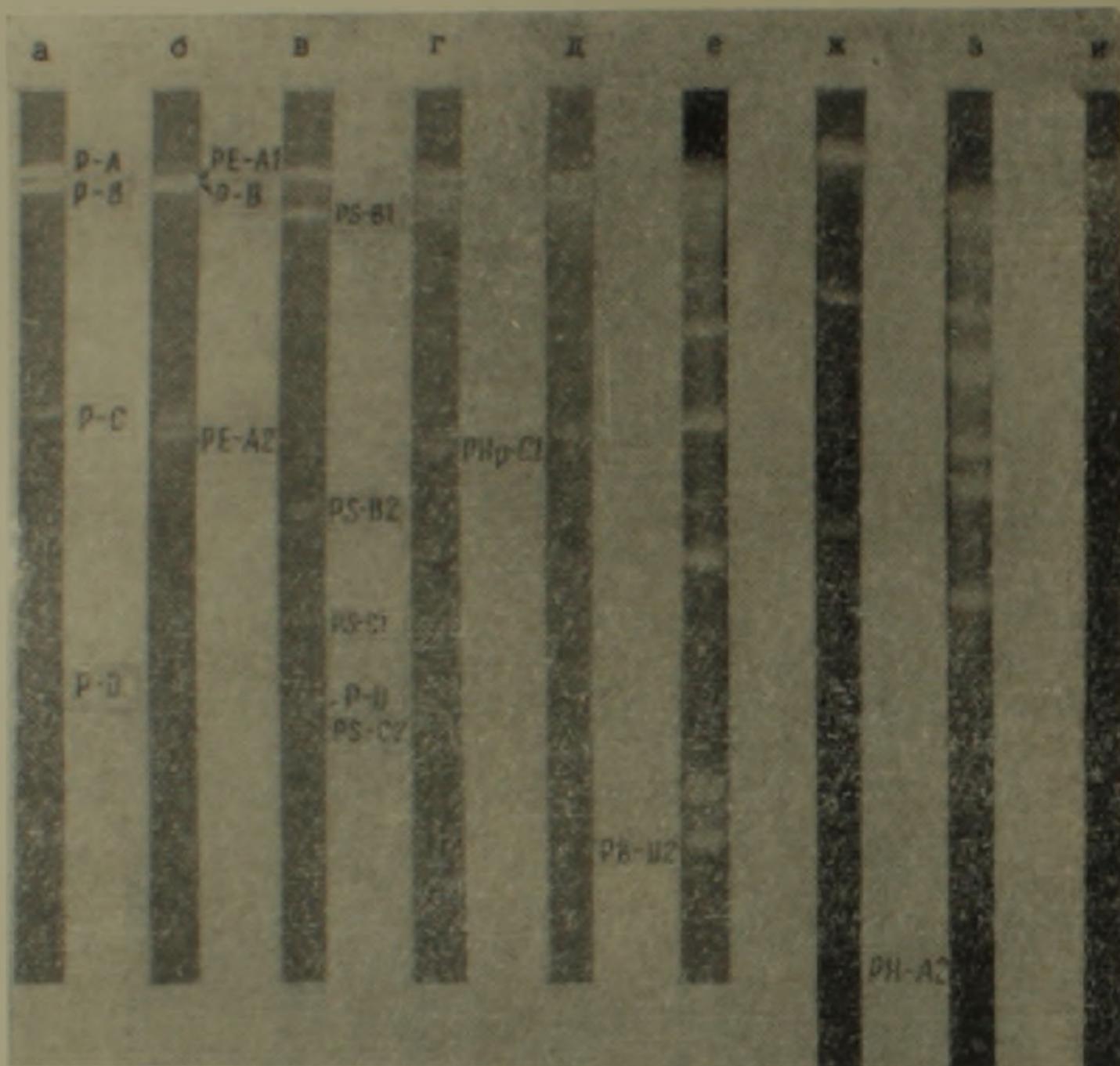


Рис. 2. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК плазмиды RP4, образующихся при действии рестриктаз: а—PstI, б—PstI+EcoRI; в—PstI+Sall; г—PstI+HpaI; д—PstI+BamHI; е—ДНК фара λ + HindIII; ж—PstI+HindIII; з—ДНК фара λ + HpaI; и—ДНК фара λ + Kpn

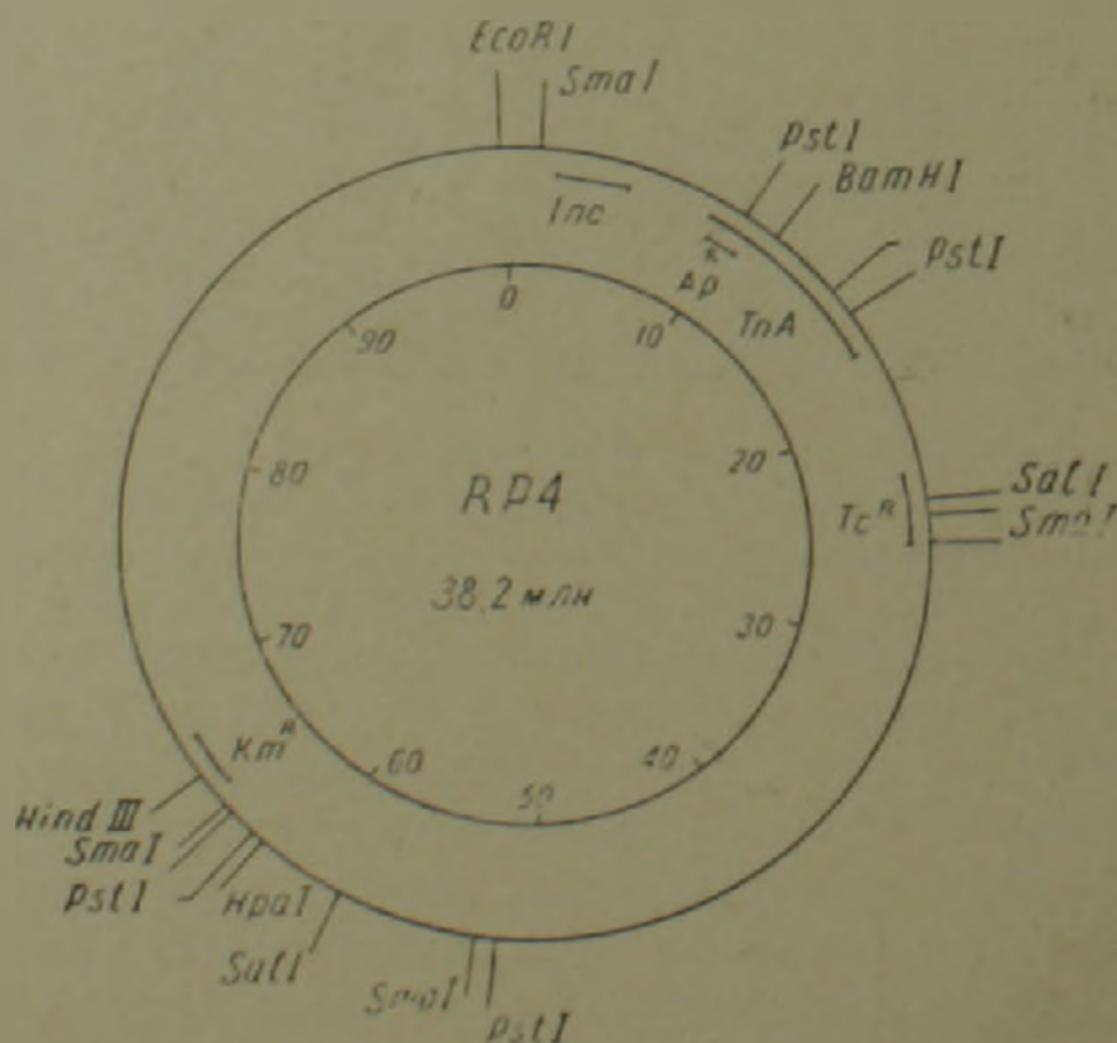


Рис. 3. Физическая карта плазмиды RP4

рестриктазы PstI. Локализация двух маленьких фрагментов E и F была определена измерением молекулярных весов фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК плазмиды рестриктазами PstI и HindIII, HpaI и Sall, а также при совместном расщеплении рестриктазами HindIII и HpaI (рис. 1, 2). Размеры образующихся фрагментов приведены в таблице.

Таким образом было установлено положение всех шести участков узнавания рестриктазы PstI на ДНК RP4. Только один участок узнавания рестриктазы BamHI был обнаружен нами на ДНК плазмиды RP4 (1). Ранее было показано также, что в транспозоне TnA имеется один участок узнавания рестриктазы BamHI, который расположен на расстоянии 1 МД от одного из концов транспозона TnA (5). Таким образом можно локализовать ампицилиновый транспозон в районе расположения участка узнавания рестриктазы BamHI. Точная ориентация TnA была установлена на основании положения участков узнавания рестриктазы PstI. Такое же взаимное положение участков узнавания рестриктаз PstI и BamHI было обнаружено и в случае плазмиды pRSF2124, которая также содержит транспозон TnA (6). К настоящему времени построены рестрикционные карты для плазмид RK2 и RP1, также относящихся к IncPI группе несовместимости (7, 8). Сравнение полученных карт с рестрикционной картой RP4 указывает на достаточно высокую гомологию этих плазмид, по крайней мере в отношении расщепления их ДНК исследованными рестриктазами. Необходимо отметить также неравномерное распределение участков узнавания для исследованных рестриктаз по длине молекулы RP4, а также тот факт, что в пределах ДНК RP4 содержится значительно меньше участков узнавания для рестриктаз EcoRI, HindIII, Sall, чем следовало бы ожидать из случайного распределения специфических последовательностей нуклеотидов в ДНК с молекулярным весом 38 МД. Специфические участки расщепления ДНК RP4 исследованными рестриктазами сосредоточены, в основном, в районах плазмиды, детерминирующих лекарственную устойчивость. Видимо, эволюция плазмиды RP4, которая привела к ее космополитной природе, шла не только в направлении создания достаточно универсальных систем конъюгации и репликации, но также и в направлении возникновения генома с минимальной повреждаемостью различными системами рестрикции.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Институт молекулярной биологии
АН СССР

Վ. Ս. ՍԱՅԱՐՅԱՆ, Վ. Բ. ՄՅԱԿԻՆԻՆ, Վ. Վ. ՆՈՍԻԿՈՎ, Ա. Ի. ՍՏԻՊԱՆՈՎ

RP1 պլազմիդի ռեստրիկցիոն քարտեզը

Որոշված է 7 ռեստրիկտազների ճանաչման հատվածների դիրքը RP4 պլազմիդի *Pst*-ի վրա և փաստորեն առաջին անգամ կառուցված է RP4 պլազմի-

միջի ռեստրիկցիոն քարտեզը: Իհատրիկցիոն անալիզի հիման վրա որոշված է T111 տրանսպոզոնի ճշգրիտ տեղադրումը և դիրքավորումը RP4 պլազմիդի ֆիզիկական քարտեզի վրա:

Ստացված տվյալները կարևոր ուղանակություն ունեն ինչպես RP4 պլազմիդի անսովոր ռեպլիկացիայի և կոնյուգացիայի սիստեմների ուսումնասիրության, այնպես էլ ՌՆՔ-ի նոր վեկտորային մոլեկուլների ստեղծման համար:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ B. C. Сафарян, В. В. Носиков и др., ДАН СССР, т. 238, № 2 (1978). ² P. J. Green, M. C. Bellach et al., Methods Mol. Biol., v. 7, 87, 111 (1974). ³ G. A. Wilson, F. E. Young, J. Mol. Biol., v. 97, 123 (1975). ⁴ B. C. Сафарян, Н. Тумко и др., ДАН Арм. ССР, т. 65, № 1 (1977). ⁵ F. Heffron, P. Bedingez et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 74, 702 (1977). ⁶ Meagher, Tait et al., Cell, v. 10, 521 (1977). ⁷ R. Meyer, D. Flgurski et al., MGG, v. 152, 129 (1972). ⁸ J. Grinter, P. M. Bennet et al., Plasmid, v. 1, 34 (1977).