

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.252.55

А. Ф. Казанчян, А. Г. Габриелян, М. А. Погосян, Р. А. Захарян

Тонкая структура ДНК ДНК плазмиды *pSD*

(Представлено чл.-корр. АН Армении К. Г. Карагезяном 15/XI 1990)

Исследование структуры и структурных переходов в нуклеиновых кислотах необходимо для понимания основных процессов их функционирования в клетке—репликации, транскрипции, трансляции, рекомбинации. Ранее была описана плазмидная ДНК *Salmonella derby* К 89, обуславливающая антибиотикоустойчивость данного штамма, характеризующаяся многообразием структурных форм (рис. 1) и проявлением различных фенотипических вариантов (1). Способность к сравнительно частой реорганизации генетического материала плазмиды *pSD*, не приводящей, однако, к ее нестабильности, обеспечивает достаточную пластичность ее структурно-функциональной организации, благодаря методу анализа дифференциальных кривых плавления молекулы ДНК

Особенности функционирования этой плазмиды, по-видимому, обусловлены структурными особенностями ее ДНК. В связи с этим представляло интерес исследовать структуру ДНК плазмиды *pSD*, с помощью метода анализа дифференциальных кривых плавления молекулы ДНК.

Для кольцевых замкнутых ДНК характерно исчезновение тонкой структуры кривой плавления или значительное ее сглаживание по сравнению с открытой формой той же ДНК. При плавлении кольцевых замкнутых ДНК получают многочисленные широкие пики с малой площадью и очень малой амплитудой. Такие пики не разрешаются и, накладываясь друг на друга, дают гладкую дифференциальную кривую плавления. Поэтому в наших опытах была использована линейризованная плазмидная ДНК.

Плазмиду *pSD* изолировали из штамма *S. derby* К 89 по методу Бэрпбойма и Доли (2). Перед плавлением ДНК плазмиды *pSD* депротенизировали, осаждали из-под спирта центрифугированием и растворяли в буфере 0,1×SSC. Гель-фильтрацию препарата проводили на сефакриле S—200. Плавление производили на специально оборудованном спектрофотометре Cary 219. Раствор ДНК в 1×SSC нагревали в термостатированных герметически закрытых кюветах. Регистрацию кривых плавления проводили при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,2 град/мин. Кривые дифференцировали на ЭВМ фирмы Хьюлетт-

Паккард по программе «Melting». Дифференциальные кривые нормировали машинным способом. Расчет содержания ГЦ-пар в выплавляемых блоках производили по формуле М. Д. Франк-Каменецкого (3):

$$T = 176,02 (2,6 - X_0) \times (35,8 - 7,4 \lg Na^+) \times 0,1 \times SSC; \lg Na^+ = 1,7;$$

$$T = 176 - (2,6 - X_0) \times (35,8 + 11,97) = 176 - (2,6 - X_0) \times 47,77,$$

где X_0 — доля ГЦ-пар.

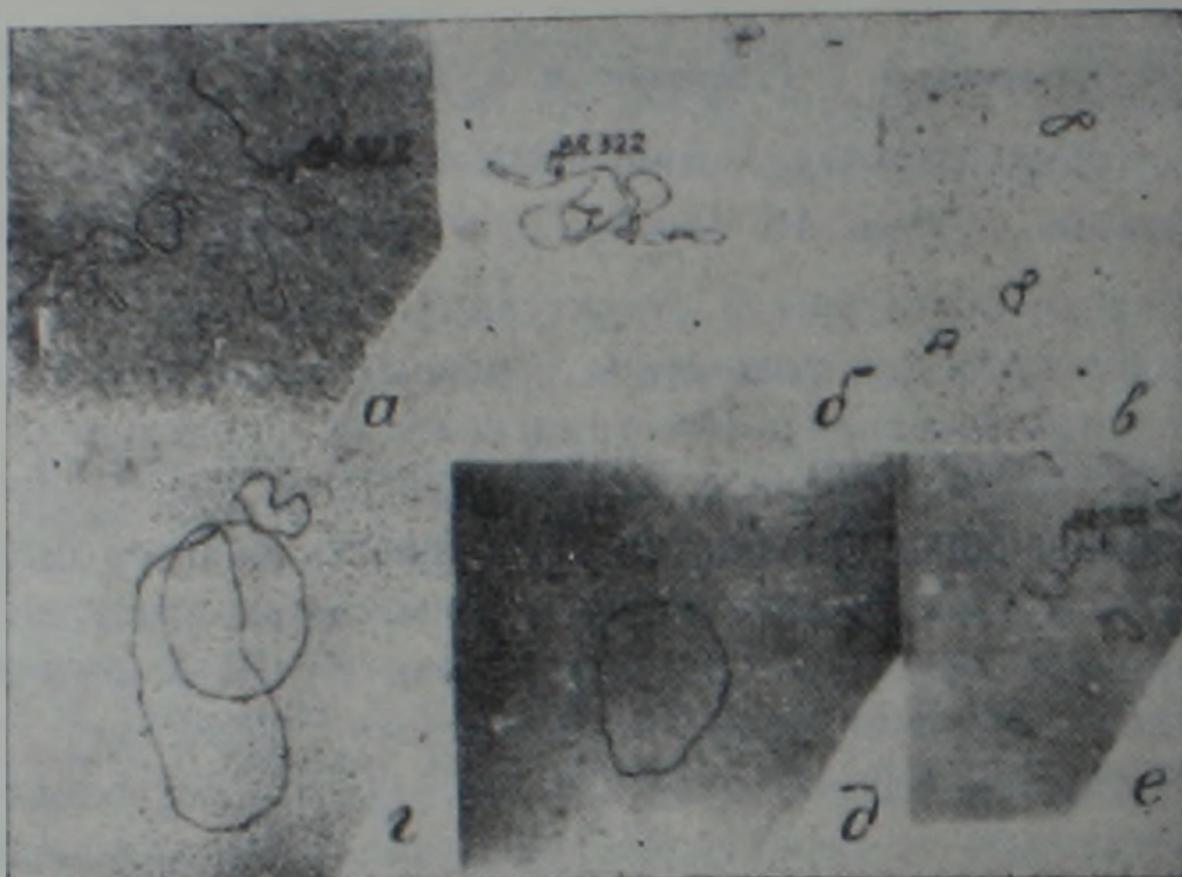


Рис. 1. Электронные микрофотографии различных структурных форм плазмидной ДНК штамма *S. derby* К 89. Маркер линейная молекула рЗК 322 (4362 тпн): а, б, в, г — низкомолекулярные плазмиды (2,3; 4,4; 7,3; 8,7 тпн); ж — катенан (22 тпн); з — олигомер (11 тпн).

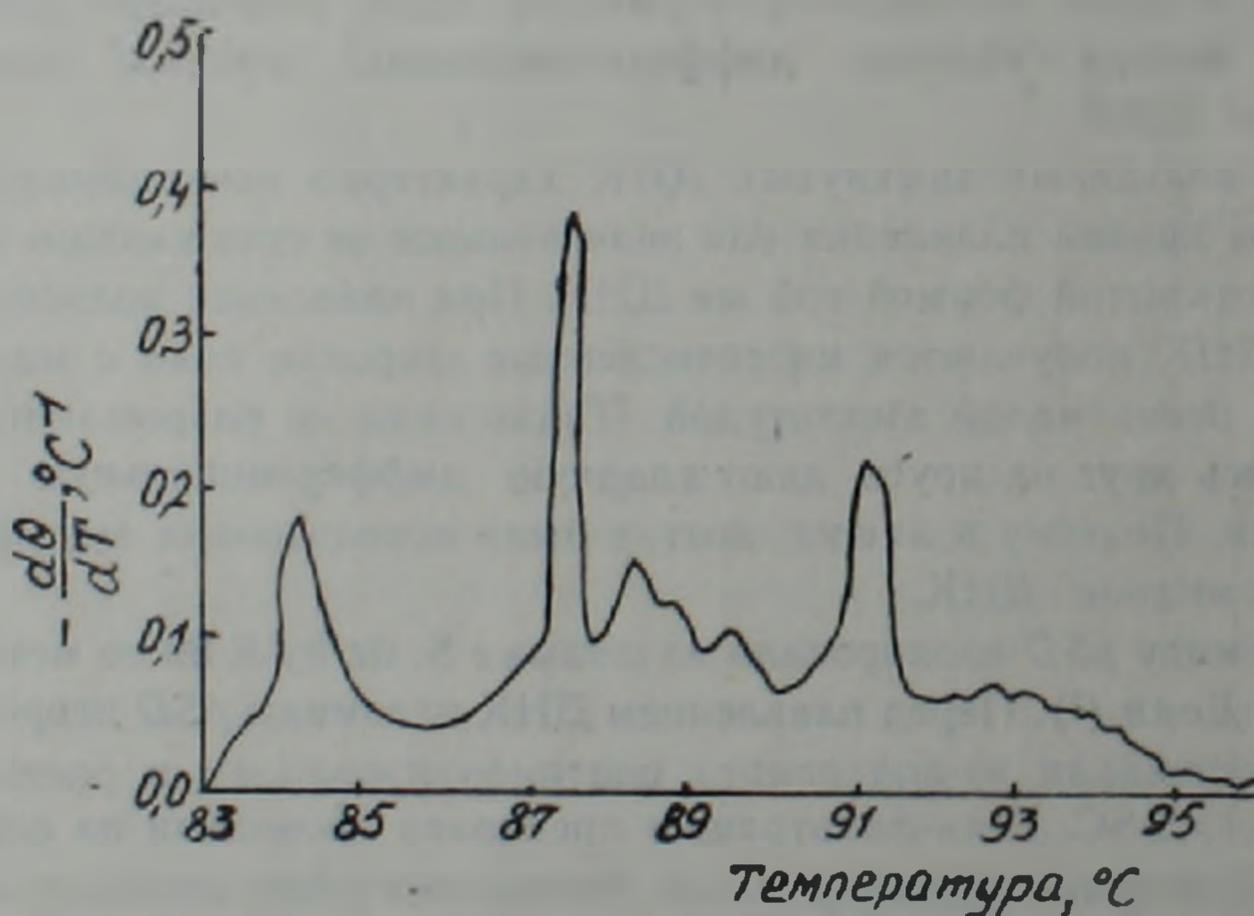


Рис. 2. Дифференциальная кривая плавления ДНК плазмиды рЗК

Для характеристики структурных особенностей плазмидной ДНК штамма *S. derby* К 89 исследовали ее плавление. Для плавления

использовалась очищенная и обработанная SI-нуклеазой ДНК плазмиды *pSD*, электрофоретически определяемая длина которой равна 2,32 тпн.

Как видно из рис. 2, тонкая структура ДКП ДНК плазмиды *pSD* четко выражена, что свидетельствует о плавлении одного типа молекул, которые могут быть представлены в мономерной или олигомерной формах, поскольку кривая плавления олигомера, состоящего из одного типа мономеров, неотличима от кривой плавления мономера.

Степень сглаженности дифференциальной кривой плавления (ДКП) дает возможность оценить длину ДНК плазмиды приблизительно в 2,3 тпн, что совпадает со значением, полученным с помощью электрофореза. Известно (4), что каждому узкому пику на ДКП соответствует выплавление целиком сравнительно длинного участка, температура которого зависит от содержания ГЦ-пар, а также от его длины и от условий на границах, т. е. от того, какими участками он окружен—расплавленными или спиральными. Эта зависимость тем сильнее, чем короче участок. На ДКП плазмиды *pSD* имеется три четких пика. При температурах, соответствующих этим пикам, выплавляются участки (или участок) в несколько сот пар нуклеотидов (в каждом пике около 10% всей молекулы). ДНК плазмиды *pSD* характеризуется не очень широким распределением ГЦ-пар; она, по-видимому, плавится короткими участками. Плаزمида является АТ-богатой. ГЦ составы трех участков, соответствующих трем главным пикам, равны соответственно 0,34; 0,42 и 0,51.

На основании результатов исследования можно констатировать, что плазмиды *pSD* имеет уникальную ДКП с ярко выраженной тонкой структурой, особенностью которой является наличие сравнительно больших легкоплавких областей.

Блочность АТ-насыщенных участков ДНК может играть роль в обеспечении гибкости реорганизации генетического материала плазмиды.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армении

Ա. Յ. ՂԱԶԱՆՉՅԱՆ, Ա. Գ. ԳԱՐՐԻԵԼՅԱՆ, Մ. Ա. ԳՈՂՈՍՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ
pSD պլազմիդի ԴՆԹ-ի ձևավան կորեքի նուրբ կառուցվածքը

Ուսումնասիրվել է *pSD* պլազմիդի ԴՆԹ-ի կառուցվածքը՝ օգտագործելով ԴՆԹ-ի հալման մեթոդը: Պլազմիդային ԴՆԹ-ի հալման դիֆերենցացված կորը ունի կտրուկ արտահայտված 3 գագաթներ, որոնք համապատասխանում են 0,34, 0,42 և 0,51 ԳԱ-պարունակություն ունեցող շրջաններին:

Պլազմիդի ԴՆԹ-ն հարուստ է ԱՏ-զույգերով: Հալման կորի հարդեցման աստիճանը թույլ է տալիս մոտավորապես գնահատել պլազմիդի ԴՆԹ-ի երկարությունը, որը համապատասխանում է այլ մեթոդներով ստացված արժեքին՝ 2,3 հազար նուկլեոտիդային զույգերի:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1 А. Ф. Казанчян, Биол. журн. Армении, т. 38, № 11, с. 1016—1019 (1985). 2 Н. С. Birnboim, J. A. Doly, Nucl. Acids Res., v. 7, № 6, p. 1513—1523 (1979). 3 М. D. Frank-Kamenetskii, Biopolymers № 10, p. 2623 (1971). 4 Ю. С. Лазуркин, Молекулярная биология, т. 11, № 6, с. 1311—1324 (1977).