

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.1:577.15:576.851

И. В. Вартересян, Ж. А. Кцоян, Г. К. Шахбазян,
академик НАН Армении К. Г. Карагезян

Физическая характеристика R-фактора в штамме
Salmonella derby K 89

(Представлено 1/IX 1994)

Согласно результатам ряда исследований (1-4) по изучению свойств внехромосомной ДНК штамма *S. derby* K 89, определяющей множественную лекарственную устойчивость к некоторым антибиотикам и сульфаниламидам, установлено присутствие диссоциированного R-фактора (100 т.п.н.), длина наиболее крупных фрагментов которого колеблется в пределах от 22 до 3,7 т.п.н. и менес. При электрофорезе в 0,8%-ном агарозном геле отмечается разделение этой внехромосомной ДНК на пять индивидуальных фракций. Исходя из вышеизложенного, мы задались целью проследить в настоящем исследовании за количеством детерминантов диссоциирующего R-фактора, их формой, а также их генетической родственностью.

Существуют три различные формы плазмидной ДНК — 1) ковалентно-замкнутая суперскрученная молекула ДНК; 2) открытая кольцевая молекула (может образоваться при релаксации суперскрученной или в результате разрыва одной из цепей ДНК); 3) линейная молекула ДНК (5). Сопоставление электрофоретических подвижностей отмеченных разновидностей плазмидных молекул в агарозных гелях различной концентрации позволяло установить, что кольцевая форма не только уступает по скорости своей миграции остальным, но при молекулярной массе начиная от $14 - 16 \cdot 10^6$ дальтон (20-24 т.п.н.) вообще не входит в гель даже при его минимальной концентрации — 0,8%. Скорость миграции линейных молекул ДНК уменьшается с увеличением их молекулярной массы, однако до определенного предела, превышение которого за $12 \cdot 10^6$ дальтон (18 т.п.н.) характеризуется однотипностью скорости миграции этих линейных молекул в 0,8%-ном агарозном геле. Касаясь относительной подвижности суперспирализованной ДНК и линейной молекулы, следует подчеркнуть ее зависимость от молекулярной массы, среднего размера пор геля и напряженности электрического поля.

В работе был использован дикий тип *S. derby* K 89, содержащий R-фактор, придающий клеткам устойчивость к ряду антибиотиков и сульфаниламидам. Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом получения осветленных лизатов (6) с проведением ее электрофоретического анализа в 0,8%-ном агарозном геле (7). Для получения отдельных фракций использовали методику экстракции фрагментов из легкоплавкой агарозы, а обработку производили нуклеазой SI согласно существующим способам (8) при температурном режиме 37°C, с отбором аликвот каждые 10 мин. Рестрикцию проводили рестриктазами *Alu I* и *HinG I* в среднесолевым буфере.

При электрофорезе ДНК в 0,8%-ном агарозном геле помимо зоны в районе старта обнаруживаются еще четыре фракции, третья из которых как бы двойная. Использование экстракции из легкоплавкой агарозы позволило выделить индивидуальные фракции, каждую из которых обрабатывали нуклеазой SI. Полное расщепление фракции I без каких-либо дополнительных полос указывает на то, что она представлена линейными молекулами плазмидной ДНК или фрагментами хромосомной ДНК с молекулярной массой более $12 \cdot 10^6$ дальтон, двигаясь в 0,8%-ном агарозном геле с одинаковой скоростью. О присутствии во фракции I линейных молекул ДНК может свидетельствовать также наличие фракции 0 (на старте); не исключено, что она состоит из крупных плазмидных молекул ДНК в открытой кольцевой форме, не входящих в гель в наших условиях электрофореза (0,8%, 180 В, 2ч), что, по-видимому, может быть обусловлено молекулярной массой более $14-16 \cdot 10^6$ дальтон.

При обработке фракции II с помощью SI наблюдается образование одной новой полосы, что возможно, если фракция II представлена плазмидными ДНК в открытой кольцевой форме, переходящими в линейную форму.

При расщеплении с помощью SI фракции IV констатировалось образование двух новых полос, соответствующих, по всей вероятности, открытой кольцевой и линейной формам плазмидной ДНК. Следовательно, есть основание считать фракцию IV плазмидной ДНК в суперскрученной форме. Примечательно, что действие нуклеазы на двойную фракцию III сопровождается образованием трех новых полос, из которых верхние две соответствуют открытой кольцевой и линейной формам фракции II, а нижние две — открытой кольцевой и линейной формам плазмидной ДНК, образующимся при расщеплении фракции IV. Полученный нами фактический материал позволяет сделать вывод о строении двойных фракций III из открытых кольцевых молекул ДНК (верхняя полоса) и суперспирализованных молекул ДНК (нижняя полоса) двух различных плазмид. Использование маркера λ (*Eco RI*, *Hind III*) по линейным формам молекул позволило установить, что размер первой плазмидной ДНК колеблется в пределах 20-22, второй — 3,35 и третьей — 2,15 т.п.н. С целью установления генетической родственности изу-

ченных плазмид был предпринят рестрикционный анализ с применением различных рестриктаз: Eco RI, Hind III, Pst I, Sma I, Alu I, Hin GI, что позволило выделить лишь рестрикции Alu I и Hin GI, давшие четкую рестрикционную картину. При рестрикции фракций I, II, IV рестриктазой Alu I проявилась картина различных рестрикций, а фракция III рестрицировалась суммой полос, полученных при рестрикции фракций II и IV.

Аналогичные результаты были зарегистрированы при действии на фракции I, II, III, IV рестриктазы Hin GI. Примечательно, что рестрикция двойной фракции III также представляет собой сумму полос, полученных в результате рестрикций фракций II и IV.

Результаты проведенных исследований совпадают с эффектами нуклеазы SI и позволяют сделать следующее заключение:

1) Фракция I представлена линейными молекулами первой плазмидной ДНК, фракция II — второй плазмидной ДНК (в открытой кольцевой форме), двойная фракция III — открытыми кольцевыми молекулами третьей плазмидной ДНК (верхняя полоса) и ДНК второй плазмиды в суперспирализованной форме (нижняя полоса), фракция IV — суперспирализованной формой третьей плазмиды;

2) R-фактор в штамме *Salmonella derby* K 89 состоит из трех автономно реплицирующихся плазмид (вероятно, детерминанты RTF, r_1 и r_2) с различной генетической структурой и молекулярной массой.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Ի. Վ. ՎԱՐԴԵՐԵՍՅԱՆ. Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ, Գ. Կ. ՇԱՀՐԱՉՅԱՆ.

Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ

Salmonella derby K₈₉ բջիջների R-գործոնի ֆիզիկական բնութագիրը

S. derby K₈₉ շտամում հայտնաբերված է R-գործոնը, որը պայմանավորում է մի շարք հակաբիոտիկների և սուլֆանիլամիդների դեմ դեղորայքային կայունություն:

0,8% ազարոզային հելի արտաքրոմոսոմային ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզի ընթացքում R-գործոնը բաժանված է հինգ ֆրակցիայի: S₁ նուկլեազով մշակման արդյունքում պարզվեց, որ նշված ֆրակցիաներն իրենցից ներկայացնում են տարբեր ձևերում գտնվող պլազմիդներ:

Հետերոգեն այդ ԴՆԹ-ի մոլեկուլների գենետիկական ազգակցականությունը պարզելու համար Alu I և Hind III ռեստրիկտազների օգնությամբ կատարվել է ինչպես ընդհանուր արտաքրոմոսոմային ԴՆԹ-ի, այնպես էլ առանձին ֆրակցիաների ռեստրիկցիոն անալիզը:

Աշխատանքի արդյունքում կարելի է կատարել երկու ենթադրություն՝ 1) *S. derby* K₈₉ բջիջների R-գործոնը ներկայացված է երեք ավտոնոմ ռեպլիկացիայի ենթարկվող պլազմիդներով՝ հավանաբար RTF և E₁ և E₂ դետերմինանտներ, 2) ԴՆԹ-ի այդ մոլեկուլները ունեն տարբեր գենետիկական կառուցվածք:

ЛИТЕРАТУРА - ՉԲԾԾԾԼԻԹՅՈՒՆ

¹ Н.Н.Саркисян, Р.Г.Антонян, Ж.А.Кцоян, ДАН АрмССР, т.75, №1, с.45-48 (1982). ² Р.Г.Антонян, К.Г.Данагулян, Н.Н.Саркисян и др., ДАН АрмССР, т.77, №3, с.132-135 (1983). ³ Н.Н.Саркисян, Р.Г.Антонян, М.П.Светлова и др., Биохимия, т.50, вып. 4, с.673-679 (1985). ⁴ Ж.А.Кцоян, Л.М.Ханбекян, К.А.Аракслова и др., ДАН АрмССР, т.85, №3, с.125-128 (1987). ⁵ *Miscel c.a.*, *Nucl. Acids. Res.*, v.4, p.1465-1482 (1977). ⁶ *P.Guetti, D.J.Zeblank, I.Falkow, J.Bactereol.*, v.116, p.1064-1066 (1973). ⁷ *E.M.Santhenn, J.Mol.Biol.*, v.98, p.503-507 (1974). ⁸ *K.Truong, N.Panayotatos, Nature*, v.289, p.466 (1981).