

устойчивости к ртути внутри рода *Acinetobacter*, но и обладает потенциальными способностями к их миграции и перодективные бактерии. Дальнейшие исследования покажут, происходит ли это на самом деле.

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Поступило 13.VIII 1985 г.

Hg^r — ՊԼԱԶՄԻԴՆԵՐԻ ԿՈՆՅՈՒԴԱՑԻՈՆ ՓՈԽԱՆՑՄԱՆ ՍԻՍՏԵՄԸ

ACINETOBACTER-Ի ՄՈՏ

Ս. Չ. ՄԻՆԴԼԻՆ, Գ. Մ. ԳՈՐԼԵՆԿՈ

Խանդարկանի սնդիկա-ծարրային հանքավայրից անջատված *Acinetobacter* լծի հողային բակտերիաներում առկա են 2 պլազմիդներ, որոնք կրում են սնդիկի միացությունների նկատմամբ կայունության ղեկավարման $pKL2(60$ և. հ. դ.) պլազմիդը ընդունակ է կոնյուգատիվ փոխանցման *Acinetobacter*-ի բջիջներում: $pKL1$ (7,5 և. հ. դ.) պլազմիդը չունի կոնյուգատիվ առանձնահատկություններ, բայց $pKL2$ -ի օգնությամբ կարող է ներթափանցել սնդիկի նկատմամբ ղեկավարման բակտերիաների մեջ, այդ թվում սիստեմատիկ տեսանկյունից հեռավորների մեջ, ինքնազրկում է, որ *Acinetobacter*-ի մոտ հայտնաբերված Hg^r -ղեկավարման կոնյուգատիվ փոխանցման սիստեմը կարող է ապահովել սնդիկի միացությունների նկատմամբ կայունությունը բակտերիաների լայն շրջանում:

SYSTEM OF CONJUGATION TRANSFER OF THE Hg^r PLASMIDS IN *ACINETOBACTER SP.*

S. Z. MINDLIN, G. M. GORLENKO

In soil bacteria of the *Acinetobacter sp.* isolated in the Khaidarkan mercury and antimony mine there are two mercury-resistant plasmids. The larger plasmid, $pKL2$ (60 kb) is capable of conjugational transfer to *Acinetobacter* sensitive cells. The smaller one, $pKL1$ (7.5 kb) displays no such transfer but with the aid of $pKL2$ can penetrate into mercury sensitive bacteria including those systematically remote. It is suggested that the Hg^r determinant conjugational transfer system revealed in *Acinetobacter* might be responsible for the distribution of $HgCl_2$ resistance in diverse bacteria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ломовская О. Л., Миндлин С. З., Горленко Ж. М., Хесин Р. Б. Генетика, 21, 1985.
2. Хесин Р. Б. Мол. биол., 19, 505—515, 1985.
3. Baumann P., Dauteroff M., Stanier R. Y. J. Bacteriol., 97, 1520—1541, 1968.
4. Eckhardt T. Plasmid, 1, 594—588, 1978.
5. Khessin R., Karasyova E. Mol. Gen. Genet., 197, 280—285, 1984.

«Биол. ж. Армения», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.24:576.851

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ $pAS8-121$ У *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*

С. В. КАМЕНЕВА, А. Н. ДУБЕЯКОВСКИЙ, Т. П. ПОЛИВЦЕВА

Предложена система конъюгации на основе плазмиды pAS 8-121, дающая возможность вводить транспозоны (Tn) и плазмиду в хромосому пурпурной несерной фото-трофной азотфиксирующей бактерии *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Осуществлены транспозиция Tn7 и введение плазмид pAS 8-121 и pAS 8-121::Tn5 в хромосому этой

бактерии, в результате чего индуцированы хромосомные мутации и вторичные перестройки хромосомной ДНК. Показано, что клетки пурпурной бактерии, несущие хромосому с включенной в них плазмидой рAS 8-121, являются донорами, осуществляющими поляризованный перенос хромосомных маркеров; получена коллекция Hfr-штаммов, мобилизующих хромосому *R. sphaeroides* с различных точек. Выделены R' варианты рAS 8-121, несущие фрагменты хромосомы пурпурной бактерии.

Ключевые слова: конъюгация, плазмиды с широким спектром хозяев, транспозон, симбиотрофные бактерии.

Собственных систем переноса генов у фототрофной бактерии *R. sphaeroides* не обнаружено. В ряде лабораторий предпринимаются попытки использовать для создания систем конъюгации у этой бактерии широкотрансмиссивных плазмид других бактерий. Показано, что в клетки *R. sphaeroides* с высокой эффективностью передаются конъюгативные плазмиды PI группы несовместимости от *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Переданные плазмиды стабильны в клетках нового хозяина и способны обеспечивать его внутривидовую и межвидовую конъюгацию [2, 8, 10, 13, 14]. Однако мобилизации хромосомы *R. sphaeroides* плазмиды PI группы в большинстве случаев не способствовали или обеспечивали перенос хромосомных генов этой бактерии с очень низкой частотой [2, 8, 14]. Включение в плазмиды мигрирующих элементов (Ti и бактериофага Mu), как правило, не давало стабильного повышения частоты переноса хромосомных генов [2, 15], за исключением отдельных случаев, специфичных для определенных штаммов [11, 13]. Недавно Нюлером с соавторами сконструирована система для введения в геном фототрофных бактерий транспозонов [12].

Нами на основе плазмиды рAS 8-121 предложена система для введения в хромосому пурпурной бактерии транспозонов и получения у нее Hfr-доноров.

Материал и методика. Штаммы бактерий, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Среды. Полноценной средой служил L-бульон или L-агар [3], минимальный средой—среда Сигстры [13]. Необходимые аминокислоты и основания добавляли в концентрации 20 мкг/мл. Антибиотики вносили в следующие количества (в мкг/мл): ампициллин (Ам)—250, канамицин (Км) и мономицин (Мм)—50, стрептомицин (Стр)—25 для *E. coli* и 50—для *R. sphaeroides*, триметоприм (Тр)—20.

Конъюгационные скрещивания между штаммами *E. coli* проводили в жидкой L-среде по Миллеру [3], межродовые (*E. coli* с *R. sphaeroides*) и между штаммами *R. sphaeroides*—на твердой среде. В опытах по передаче Ti и плазмид в клетки пурпурных бактерий использовали минимальный агар, а при переносе хромосомных маркеров—L-агар. При скрещивании свежие культуры клеток донора и реципиента смешивали в соотношении 1:1 или 1:10. По 10 мкл конъюгационной смеси наносили каплей на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. В качестве контроля таким же способом наносили по 5 мкл культур донора и реципиента в отдельности. После 16—20 ч инкубации при 32° бактериальные клетки с каждого пятна суспендировали в 1—2 мл физиологического раствора и в соответствующих разведениях высевали на селективные среды для определения титров клеток донора и реципиента, транспозантов или рекомбинантов.

Мутагenez. Обработку клеток *E. coli* этилметансульфонатом при получении Km^r вариантами плазмиды рAS 8-121 проводили по методике, описанной Миллером [3].

Плазмидную ДНК выделяли экспресс-методом [7].

Штаммы бактерий, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
E. coli K-12:		
J 53 (pAS 8-121)	(λ) pro met (Ap ^r Tc ^r Km ^r El ^{imm} Tra ⁺ RepA::Tn7)	ВНИИ Генетики, Москва
J 53 (pAS 8-121)	(λ) pro met (Ap ^r Tc ^r Km ^r ::Tn7 El ^{imm} Tra ⁺ Rep ⁺)	ВНИИ Генетики, Москва
HB 101	thr leu pro gal lac str ^r recA ⁻ rks ⁻	ВНИИ Генетики, Москва
C 609 Mn ^{dp}	thr thr leu Mn ^{dp} Sm ^{dp}	ВНИИ Генетики, Москва
KS 1324	thr thr leu his arg lac str ^r ::Tn5	ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи,
GC 146	pro met his mal3 lac gal str ^r	Москва
R. sphaeroides 2R	прототроф	МГУ, биологический факультет, кафедра микро-биологии
Пропаводные 2R		Получены нами ранее [2]
ade 9	ade 9 rif ^r str ^r	
ade 41	ade 41 rif ^r str ^r	
ade 42	ade 42 rif ^r str ^r	
arg 6	arg 6 rif ^r str ^r	
met 83	met 83 rif ^r str ^r	
phe 6	phe 6 rif ^r str ^r	
trp 1	trp 1 rif ^r str ^r	
his 11	his 11 rif ^r str ^r	
his 22	his 22 rif ^r str ^r	
his 25	his 25 rif ^r str ^r	
his 40	his 40 rif ^r str ^r	
met 83 his 5	met 83 his 5 rif ^r str ^r	

а) В скобки заключены гены плазмид; Tn7 несет гены Sm^r Tr^r Tn5 — Km^r.

Электрофорез проводили в 0,5%-ном агарозном геле в горизонтальном аппарате в течение 5—6 ч при напряжении 100 В, применяя Трис-боратный электродный буфер (Трис—90 мМ; борная кислота—90 мМ ЭДТА—2,5 мМ). Исследуемые препараты до нанесения на гель смешивали в пропорции 1:1 с раствором, содержащим бромфеноловый синий—0,07%, SDS—7%, глицерин—33%. Гель окрашивали бромистым этидием (2—5 мкг/мл в течение 20 мин), после чего смывали в течение часа и фотографировали в УФ свете на фотопленку «Микрат» с оранжевым светофильтром.

Обработку препаратов ДНК рестриктазой *EcoRI* осуществляли в течение 1—2 ч при 37° в буфере: Трис HCl—6,0 мМ, MgCl₂—6,0 мМ, NaCl—0,15 М, бычий сывороточный альбумин (BSA)—0,1 мг/мл, pH 7,9. Реакцию останавливали прогреванием при 65° в течение 5 минут.

Результаты и обсуждение. Транспозиция *Tn7* и интеграция плазмид *pAS8-121* и *pAS8-1213* в геном *R. sphaeroides* 2R. Для введения транспозонов в клетки штамма 2R пурпурной бактерии использовалась сконструированная *in vitro* на основе плазмид RP4 и ColEI гибридная плаزمида *pAS 8-121* со вставкой транспозона *Tn7* в ответственную за репликацию (*repA*) область ДНК RP4 [5]. Эта плазмида широкоанмиссивна за счет *tra* генов RP4 и реплицируется в *E. coli* за счет системы репликации ColEI; в клетках *R. sphaeroides* 2R *pAS 8-121* реплицироваться не может.

Нами введен в *pAS 8-121* дополнительно еще *Tn5*. Предварительно плазмида *pAS 8-121* была модифицирована: в результате обработки клеток *E. coli* J53 (*pAS 8-121*) этилметансульфонатом был выделен Km^r вариант—*pAS 8-1211*. Последний был конъюгативно введен в клетки штамма KS 1324, несущего *Tn5* в хромосоме. Затем при скрещивании двух штаммов *E. coli* KS 1324 (*pAS 8-121*) и GC 146, стандартным методом была получена плазмида *pAS 8-121: Tn5*, обозначенная *pAS 8-1213*.

Транспозиция *Tn7* и *Tn5* в геном пурпурной бактерии осуществлялась в проводимых на минимальном агаре межродовых скрещиваниях 2 R с последующим высевом конъюгационной смеси на селективные среды с антибиотиками, устойчивость к которым определяется транспозонами: стрептомицином в случае *Tn7* и канамицином в случае *Tn5*. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2. Видно, что маркеры Sm^r и Km^r наследуются клетками пурпурной бактерии с частотами 10⁻⁶ и 10⁻⁵ соответственно. В случае *Tn7* осуществляется как индивидуальная миграция транспозона в геном *R. sphaeroides*, так и наследование его в составе плазмиды *pAS 8-121: Tn5* наследуется преимущественно в составе плазмиды *pAS 8-1213*.

Все трансконъюганты, несущие признаки транспозонов и плазмид, как было показано при электрофоретическом анализе экстрахромосомной ДНК, не содержали в клетках автономных плазмид *pAS 8-121* и *pAS 8-1213* и не передавали контролируемых ими признаков лекарственной устойчивости другим штаммам *R. sphaeroides* при скрещивании.

Локализация вclusions *Tn7* и плазмид *pAS 8-121* и *pAS 8-1213* в геноме *R. sphaeroides* 2R. Ветавок *Tn7* и плазмид *pAS 8-121* и *pAS 8-1213* в криптические плазмиды пурпурной бактерии (м. п. 69 и 94 Мд)

Таблица 2

Передача признаков Tn7 и плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 от E. coli K-12 в R. sphaeroides 2B при конъюгации

Доноры-штаммы E. coli K-12	Трансконъюганты			
	селектируе- мые призна- ки Tn	частота переноса на клетку донора ϕ_1	наследование признаков плазмид	
			признак	частота, %
J53 (pAS 8-121)	Sm ^r	$1-3 \cdot 10^{-6}$	Km ^r	80
QC 145 (pAS 8-1213)	Km ^r	$1-5 \cdot 10^{-5}$	Tr ^r	100
J53 (pAS 8-101) ^{a)}	Sm ^r	$5-8 \cdot 10^{-3}$	Km ^r	100

a) — Плазмида, используемая в качестве контрольной, несет Tn7, внедренный в ген aph, и реплицируется в клетках R. sphaeroides 2R.

b) — частота спонтанного возникновения Sm^r и Km^r мутаций у R. sphaeroides 2R — 10^{-8} и менее 10^{-9} на клетку соответственно.

Таблица 3

Мутанты, индуцированные у R. sphaeroides 2R в результате внедрения Tn7 и плазмиды pAS 8-1213

Фенотип мутантов		Ауксотрофные							Пигментные	
		Ade	Ura	Trp	Phe	Met	Aro	His	Crt-w	Crt-g
Число мутантов,	Tn7	4	0	2	1	1	1	0	0	2
индуцированных:	pAS 8-1213	3	7	0	0	0	0	1	3	1

обнаружено не было [1]. По-видимому, они встраиваются преимущественно в хромосому, так как среди трансконъюгантов, несущих Tn7 и плазмиду pAS 8-1213 с частотами 0,4 и 0,8% соответственно, были получены ауксотрофные и пигментные мутации. Спектры их представлены в табл. 3 и показывают, что обе эти структуры могут включаться в хромосому пурпурной бактерии в различающихся для этих двух случаев точках. У клонов с включениями в хромосому Tn7 или плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 были выделены вторичные ауксотрофные мутанты [1], что указывает на возникновение хромосомных перестроек в областях их интеграции.

Плазмида pAS 8-121 может быть использована для введения в геном R. sphaeroides других транспозонов с целью получения мутаций либо более значительных перестроек генетического материала.

Выделение Hfr-штаммов. Способность плазмиды pAS 8-121 индуцировать мутации и вторичные перестройки в хромосоме пурпурной бактерии свидетельствует об ее ассоциации с хромосомой. В состоянии коинтеграта с последней плазмида должна обеспечивать ее мобилизацию с высокой частотой при конъюгации. Для проверки этой возможности один из ауксотрофных мутантов, возникших в результате внедрения в

хромосому штамма 2R плазмиды pAS 8-121, был использован в качестве донора в скрещиваниях с шестью реципиентами, несущими различные ауксотрофные мутации. Скрещивания проводили на полной среде, рекомбинанты отбирались на минимальной среде по признаку прототрофности. Как видно из табл. 4, донор 2R *sul*: pAS 8-121 обеспечивал

Таблица 4

Перенос хромосомных маркеров *R. sphaeroides* в скрещиваниях донора 2R *sul*: pAS 8-121 с различными ауксотрофами

Реципиенты — производные штамма 2R		Максимальная частота возникновения прототрофных рекомбинантов на клетку донора
переносимый маркер	частота реверсии	
<i>ade</i> 41	$< 1 \cdot 10^{-8}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
<i>phe</i> 6	$0.4 \cdot 10^{-8}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$
<i>trp</i> 1	$0.5 \cdot 10^{-8}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$
<i>arg</i> 6	$< 1 \cdot 10^{-8}$	$8.4 \cdot 10^{-4}$
<i>ade</i> 42	$< 0.3 \cdot 10^{-8}$	$3.2 \cdot 10^{-6}$
<i>ade</i> 9	$0.3 \cdot 10^{-8}$	$2.6 \cdot 10^{-6}$

Частота реверсий к *sul* — $1 \cdot 10^{-7}$.

передачу хромосомных маркеров пурпурной бактерии с высокой частотой. При этом наблюдался градиент частот образования рекомбинантов по разным маркерам от 10^{-3} до 10^{-6} на клетку донора. По-видимому, внедрение в хромосому штамма 2R плазмиды pAS 8-121 приводит к возникновению Hfr клонов *R. sphaeroides* 2R.

С целью получения коллекции Hfr-штаммов плаزمида pAS 8-121 в межклеточных скрещиваниях была введена от *E. coli* J53 (pAS 8-121) в хромосомы трех ауксотрофных мутантов штамма 2R: *met*83 *his*5, *met*83, *arg*6. 29 клонов, полученных в результате независимых внедрений pAS 8-121 в хромосомы этих мутантов (9 в первом случае и по 10 во втором и третьем), анализировались на способность к передаче хромосомных маркеров в конъюгационных скрещиваниях с десятью ауксотрофными реципиентными штаммами. Отбор рекомбинантов проводили на минимальной среде по признаку прототрофности.

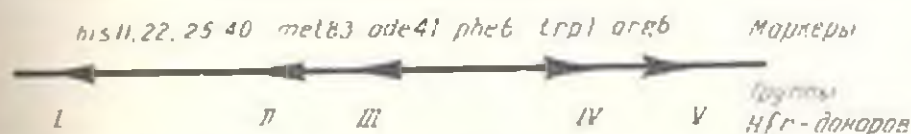
Все клоны пурпурной бактерии, несущие в хромосоме плазмиду pAS 8-121, оказались способными к передаче с высокой частотой хромосомных маркеров. При этом во всех случаях наблюдался градиент частоты переноса различных маркеров от 10^{-3} до 10^{-7} на клетку донора. По градиенту передачи различных маркеров все доноры были разделены на пять групп (табл. 5).

Следует отметить, что описываемые эксперименты позволяют определить порядок передачи донорами различных маркеров лишь грубо, так как каждый из доноров скрещивался с набором реципиентов, каждый из которых нес одну ауксотрофную мутацию. Тем не менее результаты, суммированные в табл. 5, позволяют заключить, что плазмиды pAS 8-121 встраиваются в хромосому пурпурной бактерии в несколько

Характеристика Hfr-доноров *R. sphaeroides* 2R

Доноры		Порядок передачи маркеров
тип	число клонов	
I	4	his 11, 22, 25, 40 met 83 ade 41 phe 6 trp 1
II	4	met 83 ade 41 phe 6 trp 1
III	15	ade 41 phe 6 trp 1 arg 6
IV	4	trp 1 phe 6 ade 41
V	2	arg 6 trp 1 phe 6 ade 41

ких точках. Это обеспечивает возможность получения Hfr-доноров этой бактерии, передающих ее хромосому с разных точек, и грубо определить порядок проанализированных мутаций на хромосоме (рис.).

Рис. Порядок передачи маркеров *R. sphaeroides* 2R Hfr — донорами.

Полученные Hfr-доноры могут быть использованы для локализации различных мутаций на генетической карте *R. sphaeroides* 2R при скрещивании с множественно маркированными реципиентами или при учете сцепления анализируемых аллелей с каким-либо тестерным геном.

Селекция R' плазмид, несущих фрагменты хромосом *R. sphaeroides*. Наличие контеграгов плазмиды pAS 8-121 с хромосомой *R. sphaeroides* (Hfr-штаммы) открывает перспективы получения R' плазмид, несущих участки хромосомы этой бактерии. С целью изучения стабильности контеграгов клоны *R. sphaeroides* 2R: pAS 8-121 скрещивали с *E. coli* HB 101. В случае распада контеграта плазмиды должна передаваться в клетки *E. coli* в автономном состоянии. Тестом на передачу pAS 8-121 в *E. coli* HB 101 служило приобретение клетками кишечной палочки устойчивости к канамицину, контролируемой плазмидным геном.

Анализ сорока клонов 2R: pAS 8-121 показал, что в 80% случаев плазмида передавалась из состояния контеграта и клетки кишечной палочки с частотами 10^{-1} — 10^{-2} на клетку донора. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК у Km^r трансконъюгантов *E. coli* HB 101 подтвердил наличие в них одной плазмиды, не отличающейся по молекулярной массе от исходной pAS 8-121. Следствием разрешения контеграта хромосомы *R. sphaeroides* с pAS 8-121 с исключением автономной плазмиды является возможность образования R' плазмид различной структуры.

Выделение R' плазмид по их способности комплекментировать ауксотрофные мутации *E. coli* K-12, классическим методом отбора R' факторов [9], не дало положительных результатов.

Были предприняты поиски R' плазмид среди исключенных из контеграгов делетированных вариантов pAS 8-121. Предполагалось, что делетированные участки плазмидной ДНК могут быть замещены фрагментами хромосомы *R. sphaeroides*. Для получения делетированных плазмид был использован фенотип, обнаруженный Мироновым с соавт. [4], которые показали, что при конъюгативном переносе плазмид с генами Km^r (Sm^r) в мономицин- или стрептомицинзависимые (Mn^{dr} Sm^{dr}) штаммы *E. coli* возникают трансконъюганты с плазмидами, несущими деления генов Km^r или Sm^r .

С целью получения вариантов плазмиды pAS 8-121 с делениями гена Km^r 24 клон *R. sphaeroides* 2R: pAS 8-121 скрещивали с реципиентом *E. coli* K-12 C600 Mn^{dr} . Трансконъюганты отбирали на среде с Ар и Мп, полученные Ар^r трансконъюганты анализировали на наличие гена Km^r .

Во всех скрещиваниях были получены Km^r варианты плазмиды pAS 8-121. При электрофоретическом анализе плазмидной ДНК 24 таких вариантов были обнаружены плазмиды с различными молекулярными массами.

Большинство Km^r плазмид уступало по молекулярной массе pAS 8-121, и лишь у пяти вариантов молекулярная масса была равна таковой pAS 8-121 или превышала ее. Для анализа причин изменения молекулярной массы у Km^r плазмид (вставки фрагмента хромосомы пурпурной бактерии или перестройки внутри самой плазмиды) был проведен анализ *EcoRI*-рестрикции ДНК Km^r плазмид с увеличенной молекулярной массой. Поскольку на плазмиде pAS 8-121 имеется всего три сайта узнавания для *EcoRI*, можно было ожидать, что вставки в плазмиду хромосомной ДНК пурпурной бактерии можно будет обнаружить по увеличению числа сайтов рестрикции для *EcoRI*.

Рестрикционный анализ показал, что две Km^r плазмиды имеют 12 и 14 сайтов для *EcoRI*. Это свидетельствует о том, что выделены плазмиды с нуклеотидными последовательностями, отличными от последовательностей pAS 8-121, т. е. R' плазмиды. Остальные Km^r плазмиды содержали не более одного дополнительного сайта для *EcoRI*.

Обнаруженные R' плазмиды были не трансмиссивны (Tra^-). Поскольку *tra* гены плазмиды RP4 разобщены [6], при получении делетированных вариантов pAS 8-121 велика вероятность их утери. Tra^+ варианты, по-видимому, могут быть отобраны при анализе большей выборки Km^r плазмид. Tra^- варианты R' плазмид в дальнейшем могут быть использованы для передачи различным реципиентам в скрещиваниях с Tra^+ плазмидами-помощниками.

Полученные нами R' факторы, как и исходная плаزمида pAS 8-121, не реплицируются в клетках *R. sphaeroides*. Они могут быть использованы как источник хромосомной ДНК пурпурной бактерии для конъюгативного введения ее в клетки других бактерий, способных поддерживать плазмиду ColEI, или для клонирования. Кроме того, репликационная функция R' вариантов плазмиды pAS 8-121 может быть восстановлена при рекомбинации с другими Rep^+ плазмидами.

Система конъюгации на основе плазмиды *pAS 8-121* может быть применена для разработки генетики не только *R. sphaeroides*, но и других граммотрицательных бактерий, в клетках которых не реплицируется плазмида ColEI.

Московский государственный университет,
кафедра генетики и селекции

Получено 12.VIII 1985 г.

ԳԼՈՒԽԻ ՓՈԽԱՆՑՄԱՆ ՍԻՍՏԵՄԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ *pAS 8-121* ՊԼԱՉՄԻԴԻ ՉԻՄԱՆ ՎՐԱ *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*-Ի ՄՈՏ

Ո. Վ. ԿԱՄԵՆԵՎԱ, Ա. Ն. ԴՈՒԲԵՅԿՈՎՍԿԻ, Տ. Պ. ՊՈԼԻՎՏԵՎԱ

pAS 8-121 պլազմիդի հիման վրա կոնյուգացիոն սխեման է առաջարկված, որը հնարավորություն է տալիս տրանսպոզոնները (*Tn*) և պլազմիդը ներմուծել ֆոտոտրոֆ ազոտֆիքսող *Rhodopseudomonas sphaeroides* բակտերիայի բրոմոսոմի մեջ, իրականացված են *Tn7*-ի տրանսպոզիցիա և *pAS 8-121* ու *pAS 8-121* : *Tn 5* պլազմիդների ներմուծում այդ բակտերիայի բրոմոսոմի մեջ, որի հետևանքով ինգուկցված են բրոմոսոմային մուտացիաները և բրոմոսոմային *ԴենԲ*-ի երկրորդական վերակառուցումները: Ցույց է տրված, որ բջիջները, որոնք կրում են ներմուծված *pAS 8-121* պլազմիդով բրոմոսոմներ, հանդիսանում են բրոմոսոմային մարկերների բևեռացված փոխանցումն իրականացնող դոնորներ: Ստացված է *Hfr*-շտամների հավաքածուն, որոնք տարրեր կետերից մուբիլիզացիոն են *R. sphaeroides* բրոմոսոմը: Առանձնացված են *pAS 8-121*-ի *R'* տարրերակներ, որոնք կրում են *R. sphaeroides* բրոմոսոմի ֆրագմենտներ:

GENE TRANSFER SYSTEM ON THE BASE OF PLASMID *pAS8-121* IN *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*

S. V. KAMENEVA, A. N. DUBIKOVSKI, T. P. POLIVTSEVA

A conjugation system on the base of plasmid *pAS 8-121* is proposed. The plasmid can be transferred from *E. coli K-12* to *R. sphaeroides* but cannot be replicated in the latter. This gives the possibility to transpose transposons and to insert the plasmid into the purple bacterium genome.

The transposons *Tn5* and *Tn7* have been transposed and plasmids *pAS 8-121* and *pAS 8-121/3* have been inserted into *R. sphaeroides* 2R chromosome. Transpositions and insertions cause mutations and rearrangements of chromosomal DNA in the purple bacterium.

It has been shown that strains of *R. sphaeroides* 2R which carry the plasmid *pAS 8-121* in their chromosomes are *Hfr*-donors. They realize the polarized transfer of chromosomal markers. A collection of *Hfr*-strains that transfer the *R. sphaeroides* chromosome from a few points has been isolated.

The *R'* derivatives of the plasmid *pAS 8-121* carrying *R. sphaeroides* chromosomal fragments have been selected in *E. coli K-12* cells.

1. Дубейковский А. Н., Каменева С. В. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 8, 18—22, 1983.
2. Каменева С. В., Поливцева Т. И., Коптева А. В., Муролец Е. М. Генетика, 18, 9, 1433—1441, 1982.
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
4. Мионов В. И., Слущкий А. М., Гордеев В. К. В сб. Метаболические плазмиды. Тез. докл. Всесоюз. конф., 157. Таллин, 1982.
5. Степанов А. И. Автореф. докт. дисс., М., 1979.
6. Barth P. T., Grinter N. J., Bradley D. E. J. Bacteriol., 133, 43—52, 1978.
7. Holmes D. S., Quigley M. Analyt. Biochem., 114, 193—197, 1981.
8. Miller L., Kaplan S. Arch. Biochem. and Biophys., 187, 229—235, 1978.
9. Morgan A. F. J. Bacteriol., 144, 654—661, 1982.
10. Olsen R. H., Shipley P. J. Bacteriol., 113, 772—780, 1973.
11. Pemberton J. M., Bowen A. R. J. Bacteriol., 147, 110—117, 1981.
12. Pühler A., Aguilier M. O., Hynes M., Muller P., Klipp W., Prieter U., Simon R., Weber G. In: Advances in Nitrogen Fixation Research, Ed. Veeger C., Newton W. E., 609—619, 1984.
13. Ststrom W. R. J. Bacteriol., 31, 526—532, 1977.
14. Tucker W. T., Pemberton J. M. FEMS Microbiol. Letters, 5, 173—176, 1979.
15. Tucker W. T., Pemberton J. M. FEMS Microbiol. Letters, 5, 215—217, 1979.

«Биол. Армении», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.113.576.858.9

ТРАНСПОЗИЦИЯ ГЕНОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Э. С. ПИРУЗЯН

Обобщены некоторые данные в области исследования транспозиции ДНК бактериофага М₁ и переноса и интеграции фрагмента бактериальной ДНК (Т-ДНК опухолеобразующей Т₁-плазмиды агробактерий) в хромосомы растений. Основное внимание уделяется вопросу получения минн-производных фага М₁ и конструированию на их основе интегративных векторов у прокариот. Процесс опухолеобразования у растений рассматривается в аспекте применения векторов—производных Т₁-плазмиды для переноса чужеродных генов в растительные клетки.

Ключевые слова: гениная инженерия, транспозиция генов, бактериофаг М₁, Т₁-плазмиды агробактерий, конструирование векторов.

Понятие «нестабильность генома» отражает явление транспозиции (миграции) определенных сегментов ДНК [10]. Смысл нестабильности генома заключается прежде всего в том, что в результате перемещения отдельных мигрирующих элементов ДНК и внедрения их в новые сайты происходит нарушение последовательности нуклеотидов в гене и возникает мутация. Таким образом, транспозоны играют большую роль в эволюционном процессе.