gene. The nupC — pndR — pndA — ptsH gene order has been established by means of transductional crosses. The pndA mutations are recessive to the pndA$^+$ allele both on the F' episome and cloned on pBR322 plasmid.

During enzyme purifications study two forms of PNPase2 have been established. They differ by quaternary structure (trimeric and hexameric), molecular weights of the native enzyme and its subunits, as much as substrate specificity (trimer is specific for all major purine nucleosides while hexamer does not cleave nucleosides of adenine).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аликанян С. И., Ильина Т. С., Калиева Э. С., Каменева С. В., Сиходолец В. В.* Микробиология, *34*, 666—674, 1965.
2. *Безирджян Х. О., Кочарян Ш. М., Акопян Ж. И.* Докл. АН СССР, *258*, 1236—1238, 1981.
3. *Кочарян А. М., Мелкумян М. А., Кочарян Ш. М.* Генетика, *21*, 220—228, 1985.
4. *Кочарян Ш. М., Кочарян А. М.* Генетика, *17*, 246—257, 1981.
5. *Кочарян Ш. М., Кочарян А. М., Мелкумян М. А., Безирджян Х. О., Акопян Ж. И.* Генетика, *20*, 1463—1471, 1984.
6. *Кочарян Ш. М., Смирнов Ю. В.* Генетика, *13*, 1425—1433, 1977.
7. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
8. *Alikhanian S. I., Ilina T. S., Kalfaeva E. S., Kameneva S. V., Sukhodolec V. V.* Gen. Res., *8*, 83—100, 1966.
9. *Bachman B. J.* Microbiol. Rev., *47*, 180—230, 1983.
10. *Buxton R. S., Hammer—Jespersen K., Valentin—Hansen P.* Mol. Gen. Genet., *179*, 331—340, 1980.
11. *Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci, *121*, 404—427, 1964.
12. *Jensen K. F., Nygaard P.* Eur. J. Biochem., *51*, 253—265, 1975.
13. *Hammer—Jespersen K., Buxton R. S., Hansen T. D.* Mol. Gen. Genet., *179*, 341—348, 1980.
14. *Krenitsky T. A., Koszalka G. W., Tuttle J. V.* Biochemistry, *20*, 3615—3621, 1980.
15. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning. Colg Sprind Harbor Labor., Cold Spring Harbor, New York, 1982.
16. *Munch—Petersen A.* Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobasis microorganisms. London—New—York, Acad. Press, 1983.
17. *Weber K. M., Osborn M. J.* Biol. Chem., *244*, 4406—4412, 1969.
18. *Zipkas D., Riley M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 1354—1358, 1975.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 576.851.132.095:547.963.3

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК SALMONELLA DERBY ШТАММА К-89

А. Ф. КАЗАНЧЯН

Показана структурно-функциональная вариабельность ДНК плазмид Salmonella derby К-89; в исследуемом штамме выявлены инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК, ответственные за рекомбинационные процессы в клетках бактерий и, по всей вероятности, обуславливающие структурно-функциональную вариабельность изученных плазмидных ДНК.

Ключевые слова: сальмонелла, плазмида.

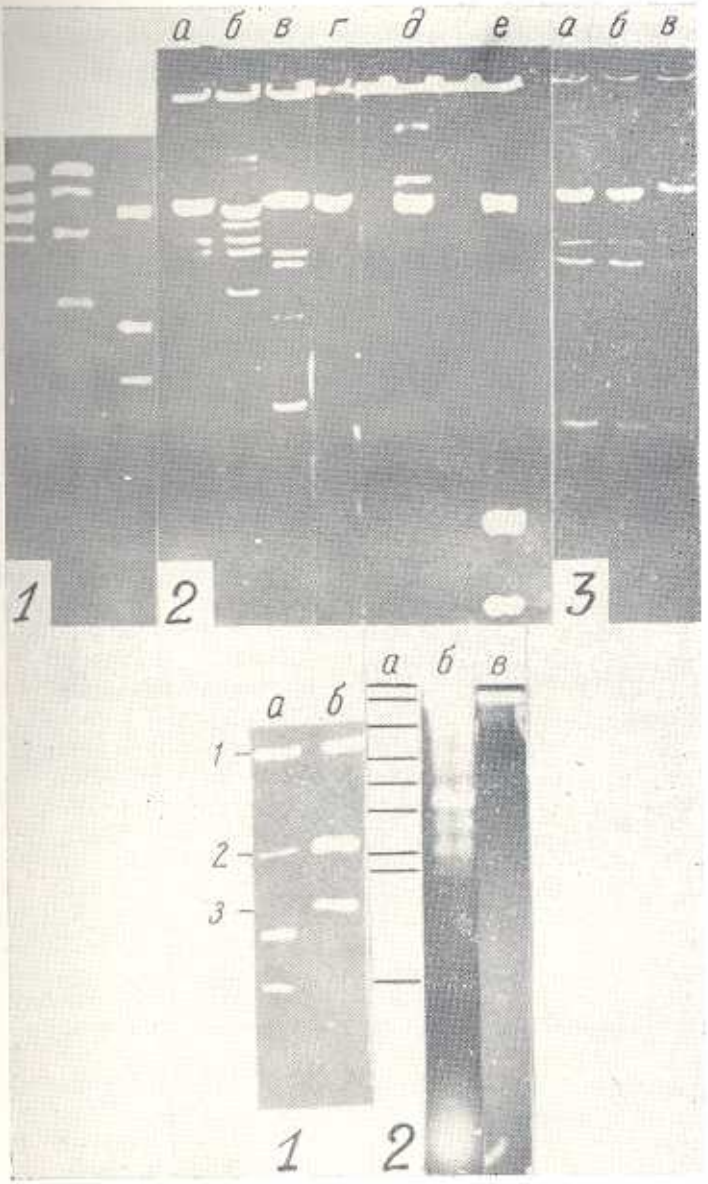

Рис. 1. 1. Электрофоретические профили плазмидных ДНК S. derby K-89 в различных условиях культивирования. 2. Электрофоретические профили плазмидных ДНК S. derby K-89 в составе трансформантов. а), б), в) E. coli J 5-3, трансформированные плазмидными ДНК 1, 2, 3. г) E. coli J 5-3; д) Pen—устойчивый трансформант E. coli J 5-3 (ДНК 3); е) CmSm—устойчивый трансформант E. coli J 5-3 (ДНК 3). 3. Электрофоретические профили плазмидных ДНК эксконъюгантов S. typhimurium AG-64. а) Pen—устойчивый эксконъюгант, б) Sm—устойчивый эксконъюгант, в) Cm—устойчивый эксконъюгант.

Рис. 2. 1. Электрофорез плазмидных ДНК S. derby K-89, обработанных (б) и необработанных (а) S1-нуклеазой. 2. Электрофорез в 1,4%-ной агарозе. а) фаг λ, обработанный Pst 1; б) инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК S. derby K-89; в) инвертированные повторы ДНК S. derby K-89 после денатурации и ренатурации.

Salmonella derby К-89 выявлен в клинических изолятах больных детей в период доминирования этого штамма в качестве основного возбудителя сальмонеллеза в Армянской ССР [4]. У данного штамма определена антибиотикоустойчивость к пенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину. Ранее нами были выделены и охарактеризованы плазмидные ДНК S. derby К-89, ответственные за данный спектр устойчивости к антибиотикам [1—3, 6].

Материал и методика. Бактерии штамма S. derby К-89 выращивали в течение 18—20 ч при 37° в питательном бульоне, приготовленном на основе рыбной пасты (50 г пасты на 1 л воды) или на агаризованной среде с антибиотиками. Осветленные лизаты получали по Гуэрри [12]. Плазмидные ДНК осаждали изопропиловым спиртом, осадок после центрифугирования промывали, суспендировали в буфере—50 мМ Трис HCl (pH 7,8), 10 мМ Na_2 ЭДТА, к которому добавляли SDS до конечной концентрации 0,7%, и инкубировали в течение 60 мин при 65° в присутствии протеиназы К (200 мкг/мл) [11]. Затем ДНК депротеинизировали и осаждали спиртом. Идентификацию плазмидных ДНК проводили путем гель-электрофореза в 1%-ной агарозе (Serva, ФРГ) в буфере 0,04 М трис-ацетата (pH 7,8), 0,02 М ацетата Na, 0,002 М Na_2 ЭДТА.

Трансформацию плазмидными ДНК S. derby К-89 проводили по описанному нами ранее экспрессному методу [6]. В качестве реципиентов при этом использовали следующие штаммы: Salmonella typhimurium AG-64, предоставленный член-корр. АМН СССР А. Г. Скавронской, E. coli C-600, E. coli J 5—3. Реципиентные штаммы исследовали на антибиотикочувствительность и отсутствие плазмидной ДНК. Трансформанты возникали с частотой 10^5—10^6 на 1 мкг ДНК. После ряда проверок на стабильность фенотипа под селективным давлением из полученных клонов выделяли плазмидные ДНК, которые анализировали электрофорезом в 1%-ной агарозе.

В качестве реципиента при конъюгации использовали штамм S. typhimurium AG-64 Nal^{res}. Конъюгацию проводили согласно руководству Миллера [7] при 37° от 15 мин до 2 ч; контрселекцию—налидиксовой кислотой в концентрации 40 мкг/мл. Конъюганты возникали с частотой 10^{-5}—10^{-4}. После проверок на стабильность фенотипа из экконъюгантов выделяли плазмидные ДНК и изучали их поведение в 1%-ной агарозе при гель-электрофорезе в течение 3 ч при 80В.

Обработку S1-нуклеазой (Serva, ФРГ) проводили по описанной методике [5]. Пробы инкубировали при 37° в течение 15, 30 мин и 1 часа. Реакцию останавливали при 65°. Оптимальная концентрация S1-нуклеазы в наших опытах составляла 500 единиц на 1 мкг ДНК.

Выделение инвертированных повторяющихся последовательной ДНК проводили по известному методу [8], идентифицировали их гель-электрофорезом в 1,4%-ной агарозе при 60 В в течение 5 часов.

Результаты и обсуждение. Электрофоретические профили плазмидных ДНК S. derby К-89, выделенных при культивировании штамма в различных условиях, показаны на рис. 1, *1*. Плазмидные ДНК варианта «б» на рис. 2, *1* предназначались для трансформации.

Приведенная таблица отражает функциональную вариабельность плазмидных ДНК S. derby К-89 при экспрессии их в гетерологичных и гомологичных системах трансформации. Внимание привлекает тот факт, что все молекулы ДНК, выявляемые при гель-электрофорезе (рис. 2, *1*), передают при трансформации все исследуемые детерминанты антибиотикоустойчивости, что хорошо прослеживается на примере реципиента S. typhimurium AG-64. Однако в случае отдельной молекулы ДНК происходит диссоциация нестабильного фенотипа PenCmSm на стабильные CmSm и Pen или PenCm и Sm. В таблице показана

различная экспрессия плазмидных ДНК в E. coli J 5-3, E. coli C-600, S. typhimurium AG-64. В наших экспериментах закономерен сам факт передачи одной молекулой ДНК независимо от молекулярной массы всех исследуемых признаков антибиотикоустойчивости, а именно Pen, Cm, Sm. В этой передаче разделяются 2 стабильных фенотипических признака PenCm и Sm в одном случае и CmSm и Pen—в другом. Ни в одном эксперименте по трансформации Cm не является самостоятельным фенотипически стабильным детерминантом, что подтверждается также опытами по конъюгации бактерий S. derby K-89 и S. typhimurium AG-64.

На рис. 1, *2*, и 1, *3* представлены электрофоретические профили плазмид S. derby K-89 в составе бактерий-трансформантов. Как видно, в них имеет место повышенная вариабельность структурных форм плазмидных ДНК.

ДНК 3 (рис. 2, *1* б, полоса 3) в штамме E. coli J 5-3, не имеющем плазмид в своем составе (рис. 1, *2* г), проявляет фенотип CmSm и Pen и при электрофорезе дает целый ряд полос, в том числе мигрирующих с крайне низкой скоростью, сопоставимой со скоростью миграции самой высокомолекулярной плазмиды (рис. 1, *2* в).

Из рис. 1, *2* и 1, *3* видно, что низкомолекулярные плазмидные ДНК образуют в трансформантах высокомолекулярные формы, а ДНК 1 в составе трансформантов дает начало ряду низкомолекулярных форм.

При конъюгации S. derby K-89 с S. typhimurium AG-64 реципиентный штамм приобретал все признаки устойчивости к антибиотикам Cm, Sm, Pen, причем Pen-устойчивые колонии были устойчивы к Cm, но не к Sm, а Sm-устойчивые—только к Sm. Cm-устойчивые колонии конъюгантов росли также на Pen-чашках и были чувствительны к Sm.

Электрофоретический анализ плазмид, выделенных из экскоңъюгантов, выявил наличие в случае с PenCm устойчивостью высокомолекулярной плазмидной ДНК, которая при Sm-устойчивости отсутствует (рис. 1, *3*).

Присутствие инвертированных повторяющихся последовательностей в генетическом материале S. derby K-89 определяли как указано в методике. На рис. 2, *2* представлены результаты гель-электрофореза в 1,4%-ной агарозе обработанного препарата плазмидных ДНК. Видно, что в составе исследуемых ДНК S. derby K-89 имеются обратные повторы ДНК с молекулярными массами, близкими по величине извест-

Таблица

Трансформация плазмидными ДНК Salmonella derby K-89

№ ДНК	Реципиенты					
	S. typhimurium AG—64		E. coli J 5—3		E. coli C—600	
ДНК № 1	PenCm	Sm	PenCm	Sm	PenCmSm	
ДНК № 2	PenCm	Sm	PenCm	Pen	Pen	Sm
ДНК № 3	PenCm	Sm	PenCmSm	Pen	PenCmSm	Pen
				CmSm	PenCm	Sm

ным инсерционным последовательностям (от 800 до 1500 т. п. н.), а также значительно превышающими их.

Результаты экспериментов убедительно показывают структурно-функциональную вариабельность плазмидных ДНК в составе S. derby К-89. Изучение фенотипически стабильных форм плазмидной ДНК выявило ряд закономерностей: каждая плазмида передает реципиентному штамму устойчивость ко всем исследуемым антибиотикам, однако во всех случаях происходит диссоциация «трехчленного» детерминанта PenCmSm на стабильные PenCm и Sm или CmSm и Pen, причем первый случай преобладает; плазмидные ДНК с низкими молекулярными массами образуют в составе трансформантов стабильные высокомолекулярные формы; высокомолекулярная ДНК 1 является кointегратом, способным существовать, возможно, как в виде олигомера, так и катенана, а соотношение этих двух структурных форм в бактериях может определяться метаболическим состоянием бактерии-хозяина, условиями роста [10].

Из приведенных экспериментальных данных явствует, что метаболической системе S. derby К-89 свойственно поддержание в своем составе определенного количества (до 3-х) стабильных структурных форм плазмид с различными молекулярными массами, фенотипически выражающими устойчивость к пенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину.

В основе всех описанных явлений лежат рекомбинационные события, происходящие на внутримолекулярном и межмолекулярном уровнях. Полученные данные свидетельствуют о том, что обнаруженные в эксперименте инвертированные повторы ДНК вовлечены в подобные рекомбинации in vivo, известные для многих штаммов [9], и создают основу для существования сложной, но закономерной вариабельности структурно-функциональных форм плазмидных ДНК S. derby К-89.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 11.VI 1985 г.

К—89 ՇՏԱՄԲ SALMONELLA DERBY ՊԼԱԶՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱ-ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՎԱՐԻԱԲԵԼՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. Տ. ԿԱԶԱՆՉՅԱՆ

Հոդվածում ցույց է տրված Salmonella derby К-8 *պլազմիդների ԴՆԹ-ի կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ վարիաբելությունը և ԴՆԹ-ի փոխակերպված կրկնվող հաջորդականությունների գոյությունը ուսումնասիրվող շտամում, որոնցով էլ հավանաբար պայմանավորված է այդ վարիաբելությունը։ 1,4 % ագարոզայում էլեկտրաֆորեզի օգնությամբ բացահայտված են հայտնի JS-ների շրջանում մոլեկուլյար կշիռներով ԴՆԹ-ների փոխակերպված կրկնություններր, ինչպես և բարձրագույն կարգի փոխակերպված կրկնությունների առկայությունը։*

STRUCTURAL–FUNCTIONAL VARIABILITY OF PLASMID DNA-s OF *SALMONELLA DERBY* K—89 STRAIN

A. F. KAZANCHIAN

Data, concerning the variability of plasmid DNA structure and function in *Salmonella derby K—89* strain are shown. It has been found out that these plasmid DNA—s harbour the inverted repeat sequences, which appear to be responsible for the mentioned plasmid DNA variability.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Казанчян А. Ф., Вартанян М. К., Исраелян Ю. Т., Агабалян А. С., Захарян Р. А.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1979.
2. *Казанчян А. Ф., Вартанян М. К., Амирханова Л. М., Агабалян А. С., Захарян Р. А.* Биолог. ж. Армении, *34*, 3, 229—233, 1981.
3. *Вартанян М. К., Казанчян А. Ф., Амирханова Л. М., Агабалян А. С., Захарян Р. А.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 8, 42—45, 1982.
4. *Матевосян Н., Карабеков Б., Вартанян М.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1971.
5. *Дрыгин Ю. Ф., Зверев В. В.* Мол. биол., *16*, 633—636, 1982.
6. *Казанчян А. Ф.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1983.
7. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
8. *Ohtsubo H., Ohtsubo E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. *73*, 7, 2316—2320, 1976.
9. *Bukhari A. G., Shapiro G. A., Adhya S. L.* In: DNA Insertion Elements Plasmids and Episomes. Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
10. *Bazaral M., Helinsky D. R.* Biochemistry, 7, 3513—3520, 1968.
11. *Faust R., Spizizen G., Gage V., Travers R.* Journal of Invertebrate Pathology, *33*, 2, 233—238, 1979.
12. *Guerry P., Le Blanc D. G., Falkow S.* Journal of Bacteriology, *116*, 1064—1066 1973.