

УДК 575.23

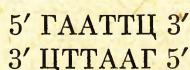
ГЕНЕТИКА

А. А. ПРОЗОРОВ, Л. В. ГЕНИНГ, В. Г. ДЕБАБОВ

ПРИМЕНЕНИЕ РЕСТРИКАЗЫ ESO RI ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 3 III 1976)

Ферменты, «опознающие» определенные последовательности нуклеотидов на молекуле ДНК и разрушающие ее в этих участках, так называемые рестриктазы, нашли широкое применение в генной инженерии для получения фрагментов ДНК определенной величины, т. н. рестриков. Недавно было установлено ⁽¹⁾, что обработка ДНК *Bacillus subtilis* посредством рестриктазы ESO RI снижает трансформирующую активность ДНК, но степень этого снижения неодинакова для разных маркеров. В настоящей работе мы попытались использовать высокую специфичность действия рестриктазы ESO RI, «опознающую» последовательность.



для нахождения локальных различий в нуклеотидных последовательностях ДНК близкородственных микроорганизмов, способных к генетической трансформации.

Методика выделения и очистки рестриктазы описана раньше ⁽²⁾. Были взяты следующие близкородственные бациллы: *Bac. subtilis* 168, *Bac. atterrimus*, W23 и NRS 231. *Bac. subtilis* 168 — лабораторный штамм, генетически хорошо маркированный и считающийся «эталонным» штаммом *Bac. subtilis*. *Bac. atterrimus* (синоним — *Bac. subtilis* var. *atterrimus*) обычно считается подвидом *Bac. subtilis* ⁽³⁾. W 23 — один из лабораторных штаммов бацилл, похожий на *Bac. subtilis* 168, но отличающийся по некоторым свойствам ⁽⁴⁾. NRS 231 (названный так по первым буквам наименования коллекции, из которой он происходит) также очень похож на *Bac. subtilis* 168, но несет так называемые протофаги иного типа ⁽⁵⁾. У *Bac. subtilis* 168 ГЦ-состав ДНК равен 43,9 ⁽³⁾; у W23 — 45,6; около 90% ДНК этой бациллы гибридизируется с ДНК *Bac. subtilis* 168 ⁽⁴⁾. Соответствующими данными по *Bac. atterrimus* и NRS 231 мы не располагаем. ДНК из стационарной культуры всех этих бацилл была выделена по методу Мармура ⁽⁶⁾, обработана рестриктазой ⁽²⁾, затем подвергалась фенольной депротенинизации, пересаживалась спиртом и растворялась в 0,05 М трис-буфере (pH 7,2).

Мы испытывали трансформирующую активность ДНК перечисленных бацилл по 10 различным аутокотрофным маркерам до и после обработки рестриктазой. В качестве реципиентов были взяты мутанты *Bac. subtilis* 168: BD25 *PurA16 leu8 MetB5 Nic38*, BD71 *his A1 ArgC4 Ura1*, SB25 *trpC hisB2*, SB25' *trpC thi1*. Видно (табл. 1), что образцы ДНК всех четырех бацилл обладали при трансформации нативной ДНК по одному и тому же маркеру сходной эффективностью. Разница была не более чем двукратной, причем частота гетерологичной трансформации иногда даже превышала частоту гомологичной, особенно при использовании ДНК *Bac. atterrimus*. Это явление описывалось и раньше ⁽⁷⁾, и осталось без объяснения.

Сравнительная эффективность трансформации по различным маркерам мутантов *Bac. subtilis* 168 посредством нативной и обработанной рестриктазой *Eco* RI гомологичной и гетерологичной ДНК

Маркеры	<i>Bac. atterrimus</i>		W23		NRS 231		Остаточная активность рестрицированной ДНК <i>Bac. subtilis</i> 168, % от активности нативной ДНК
	до обработки	после обработки	до обработки	после обработки	до обработки	после обработки	
met B5	1,7	0,1	1,3	1,9	1,7	1,8	0,2
nic 38	1,8	0,4	1,0	1,0	1,0	0,8	1,2
leu 8	0,9	0,9	1,1	0,8	1,1	0,5	0,007
ura 1	0,7	0,3	0,9	0,4	1,0	0,2	0,3
arg C4	0,8	0,3	1,1	0,6	0,7	0,7	0,01
his A1	0,7	0,05	1,1	0,3	0,9	0,2	4
his B2	1,5	0,15	1,0	0,7	1,0	0,3	6
trp C	2,1	0,2	1,1	1,3	1,3	1,0	5
his B2-trp C	1,2	0,02	1,3	1,3	1,4	1,0	2
thi 1	0,5	2,0	0,6	1,0	0,9	0,1	4

Примечание. Сравнительная эффективность трансформации равнялась отношению числа трансформантов, полученных под действием гетерологичной ДНК, к числу трансформантов, полученных под действием гомологичной ДНК. В случае нативной ДНК абсолютное число трансформантов в 1 мл компетентной культуры колебалось, в зависимости от маркера, в пределах 60 тыс.—10 тыс. Конечная концентрация нативной ДНК при трансформации равнялась 1 мкг/мл, рестрицированной ДНК 4 мкг/мл. Приведенные в таблице величины вычислены на основании данных одного из трех идентичных опытов.

Обработка рестриктазой снижала трансформирующую активность по разным маркерам от 0,01 до 6% от исходного уровня. При этом активность одного и того же маркера в ДНК разных бактерий в ряде случаев менялась неодинаково. Например, у рестриктов *Bac. atterrimus* трансформирующая активность маркера metB5 была меньше в 10 раз, маркера hisA1 — в 20 раз, а при совместной передаче маркеров trpC и hisB2 — в 50 раз, чем у рестриктов *Bac. subtilis* 168. Вместе с тем, у рестриктов *Bac. atterrimus* активность маркера thi1 упала относительно меньше, чем у *Bac. subtilis* 168. Напротив, активность этого маркера у рестриктов NRS 231 снизилась весьма сильно. Наибольшим сходством по относительному падению активности испытанных маркеров обладали рестрикты *Bac. subtilis* 168 и W23. В общем, каждый маркер после обработки рестриктазой имел свою характеристику падения активности, и, в зависимости от того, из какой бактерии была получена ДНК, эти характеристики могли сильно различаться.

Несомненно, что инактивация трансформирующей ДНК происходит из-за ее фрагментирования рестриктазой. Фрагментирование, в первую очередь, влияло, видимо, на эффективность включения участка ДНК с тем или иным маркером в ДНК клетки-реципиента. Вероятно, чем ближе рестрицируемый участок лежит к маркеру, тем сильнее инактивируется этот маркер. Нельзя исключить и того, что компетентные клетки могли в неодинаковой мере поглощать длинные и короткие рестрикты, что, конечно, также влияло на уровень биологической активности соответствующих маркеров. Таким образом, разрывы могли влиять на разные этапы трансформации, хотя, скорее всего, они действовали в основном на стадии рекомбинации.

Рестрицируемые последовательности нуклеотидов, видимо, образуют на любой ДНК специфический, неповторимый узор, который является одной из видовых, или даже популяционных, характеристик. Картирование рестрицируемых участков, как нам кажется, может служить одним

из методов геносистематики микроорганизмов, у которых возможна генетическая трансформация или трансфекция. Этот метод мог бы оказаться особенно полезным в случае близкородственных микроорганизмов, когда такие признаки геносистематики, как определение валового нуклеотидного состава и степени гомологии ДНК, практически не дают различий. В какой-то мере это может походить на цитологический анализ делеций и инверсий в хромосомах высших организмов, с успехом применяемый в генетике популяций⁽⁸⁾. Если будут найдены способы, позволяющие определить местонахождение участков рестрикции на генетической карте иными путями, помимо трансформации и трансфекции, то этот метод может найти более широкое применение.

Мы выражаем благодарность М. В. Кажуро за большую помощь в работе.

Институт общей генетики
Академии наук СССР

Поступило
3 III 1976

Всесоюзный научно-исследовательский
институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов
Москва

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Harris-Warrick, Y. Elkana et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 72, № 6, 2207 (1975). ² С. И. Алиханян, О. И. Хлебалина и др., Генетика, т. 9, № 34 (1975). ³ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology; VIII Ed., Baltimore, 1975. ⁴ F. Young, A. Wilson, Spores, v. 5, Washington, 1972, p. 77. ⁵ K. Csiszar, G. Ivanovics, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., v. 12, № 1, 73 (1965). ⁶ J. Marmur, J. Mol. Biol., v. 3, № 2, 208 (1961). ⁷ J. Marmur, E. Seamen, J. Levine, J. Bacteriol., v. 85, № 2, 461 (1963). ⁸ Н. П. Дубинин, Н. Н. Соколов, Журн. общ. биол., т. 1, № 4, 543 (1940).