



УДК 547.063.32

ПОИСК СИСТЕМ МОДИФИКАЦИИ-РЕСТРИКЦИИ ДНК У АГРОБАКТЕРИЙ

Т. В. Стефанишина, И. Г. Богдарина, Я. И. Бурьянов

Вирулентные агробактерии, содержащие *Ti*-плазмиды, на основе которых созданы векторы для введения чужеродных генов в растительные клетки, широко используются в качестве реципиентов плазмидных ДНК в системах конъюгации и трансформации. В связи с этим был изучен один из аспектов, определяющих реципиентные возможности агробактерий — наличие систем модификации-рестрикции у ряда штаммов этих микроорганизмов.

Характеристика штаммов агробактерий, использованных в работе
Characterization of the Agrobacteria strains studied

Штамм	Плазмиды	Родительский штамм	Вирулентность, катаболизм олинов	Источник получения штамма
C58	<i>pTiC58, pAtC58</i>	C58	оис, пос	Phabagen collection
C58-C9	<i>pAtC58</i>	C58	оис ⁻ , пос ⁻	— « —
C58-C9Bt ₁	<i>pTiBt, pAtC58</i>	C58	оис, осс	Получен нами
LBA672	<i>pTiB6S3: :pTiC58, pAtC58</i>	C58	оис, пос, осс	Phabagen collection
8934	<i>pTi8934, pAt8934</i>	8934	оис, пос	Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР
8933	<i>pTi8933, pAt8933</i>	8933	оис, пос	Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР
K14	<i>pTiK14</i>	K14	оис, пос	Phabagen collection
LBA4012	<i>pTiAch5</i>	Ach5	оис, осс	«
LBA4011	—	Ach5	оис ⁻ , осс ⁻	«
LBA4301	—	Ach5	оис ⁻ , осс ⁻	«
Bt ₃	—	Bt	оис ⁻ , осс ⁻	Получен нами
Bt	<i>pTiBt</i>	Bt	оис, осс	Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР
8628	<i>pTi8628, pAt8628</i>	8628	оис, осс	«
8466	<i>pAr8466</i>	8466	оис ⁻ , осс	«
1000	<i>pTi1000</i>	1000	оис, осс	Университет, г. Брно
1058	<i>pTi1058</i>	1058	оис, осс	«
2835	<i>pTi2835, pAt2835</i>	2835	оис, осс	«
2055	<i>pAt2055</i>	2055	оис ⁻	«
B6	<i>pTiB6, pAtB6</i>	B6	оис, осс	J. Lippincott, США

Характеристика штаммов агробактерий, использованных в работе, приведена в таблице. Агробактерии выращивали в среде YEB [1]. Бактериальную ДНК выделяли по методу [2] с некоторыми модификациями. Гидролиз ДНК рестриктазами *MvaI* и *EcoRII* проводили при 37 °С в течение 1—2 ч в реакционной среде, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол, 1 мкг ДНК и 2 ед. фермента. Электрофорез ДНК проводили в аппарате для горизонтального электрофореза в 0,7 %-ном агарозном геле и трис-боратном буфере (89 мМ трис, 89 мМ борная кислота, 2,5 мМ ЭДТА, рН 8,3) при напряжении 5 В/см. В основе определения ферментов моди-

фикации-рестрикции ДНК изошизомеров и изометиломеров известных рестриктаз и ДНК-метиляз лежит анализ устойчивости бактериальных ДНК из различных штаммов агробактерий к определенной рестриктазе. Этот метод позволяет по устойчивости бактериальной ДНК к данной рестриктазе судить о наличии в клетке ДНК-модифицирующего фермента со специфичностью, соответствующей этой рестриктазе. Выделение эндонуклеазной активности проводили по методу [3].

В работе использованы 19 штаммов агробактерий (таблица), в том числе вирулентные штаммы, содержащие *Ti*-плазмиды различных клас-

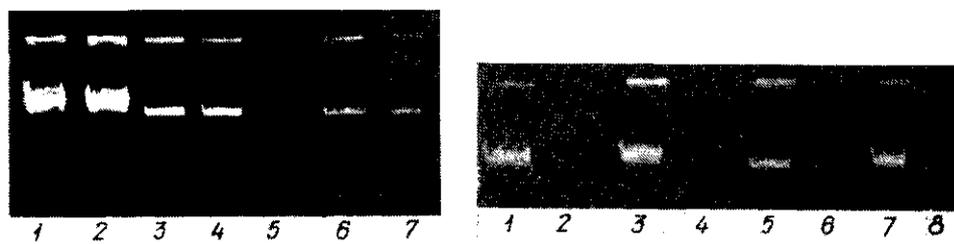


Рис. 1. Электрофорез ДНК агробактерий в 0,7 %-ном геле агарозы: 1, 3, 6 — ДНК штаммов *A. tumefaciens* В6, Вt, 1000 соответственно, не обработанная *R·EcoRII*; 2, 4, 7 — та же ДНК, но обработанная *R·EcoRII*; 5 — ДНК *A. tumefaciens* (штамм Вt), обработанная *R·MvaI*

Fig. 1. 0.7 % agarose gel electrophoresis of *Agrobacterium* DNA: 1, 3, 6 — DNA from *Agrobacterium tumefaciens* strains В6, Вt, 1000, respectively, not digested by the restriction endonuclease *EcoRII*; 2, 4, 7 — DNA from the same *Agrobacterium* strains digested by the restriction endonuclease *EcoRII*; 5 — DNA from *Agrobacterium tumefaciens* (strain Вt) digested by the restriction endonuclease *MvaI*

Рис. 2. Электрофорез ДНК агробактерий в 0,7 %-ном геле агарозы: 1, 3, 5, 7 — ДНК штаммов *A. tumefaciens* С58, 8934, 8933 и К14 соответственно, не обработанная *R·EcoRII*; 2, 4, 6, 8 — та же ДНК, но обработанная *R·EcoRII*

Fig. 2. 0.7 % agarose gel electrophoresis of *Agrobacterium* DNA: 1, 3, 5, 7 — DNA from *Agrobacterium tumefaciens* strains С58, 8934, 8933 and К14, respectively, not digested by the restriction endonuclease *EcoRII*; 2, 4, 6, 8 — DNA from the same *Agrobacterium tumefaciens* strains digested by the restriction endonuclease *EcoRII*

сов, авирулентные производные октопиновых и нопалиновых штаммов, полученные путем излечения вирулентных штаммов агробактерий от *Ti*-плазмид, а также природные изоляты авирулентных агробактерий.

Изучение устойчивости ДНК этих штаммов агробактерий к рестриктазе *EcoRII*, которая является изошизомером рестриктаз *AtuBI* и *AtuII*, обнаруженных в двух штаммах *Agrobacterium tumefaciens* В₈806 и ID135 [4], показало, что ДНК из всех штаммов агробактерий, содержащих октопиновые *Ti*-плазмиды, а также излеченных авирулентных производных октопиновых штаммов, оказались устойчивыми к рестриктазе *EcoRII*. О наличии сайтов узнавания для *R·EcoRII* в ДНК анализируемых штаммов судили по гидролизу этой ДНК рестриктазой *MvaI*. *R·MvaI* является изошизомером рестрикционной эндонуклеазы *EcoRII*, которая в отличие от *R·EcoRII* способна гидролизовать ДНК, метилированную со специфичностью, соответствующей *R·EcoRII*. Типичные электрофореграммы, полученные после обработки рестриктазой *EcoRII* ДНК октопиновых штаммов, приведены на рис. 1. ДНК же всех остальных штаммов агробактерий, в том числе нопалиновых и их производных, подвергалась гидролизу рестриктазой *EcoRII* (рис. 2).

Эти данные свидетельствуют о наличии, по крайней мере, у изученных октопиновых штаммов агробактерий, а также у их авирулентных производных системы модификации ДНК со специфичностью, соответствующей *R·EcoRII*. Так как большинство известных ДНК-метиляз является компонентом систем модификации-рестрикции ДНК, то с высокой степенью вероятности эти штаммы содержат не только метилазу, но и соответствующую рестриктазу. Действительно, в двух произвольно взятых для анализа штаммах агробактерий — Вt и Вt₃ — нами

была обнаружена рестриктазная активность со специфичностью, соответствующей рестрикционной эндонуклеазе *EcoRII*. Выделение рестрикционной эндонуклеазы проводили гель-фильтрацией (ультрагель АСА 44, «ЛКВ», Швеция) частично очищенного бесклеточного экстракта, полученного по методу [3]. В качестве субстрата для тестирования рестриктазной активности использовали ДНК *pBR322* и фага λ (рис. 3).

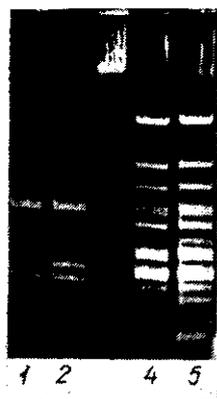


Рис. 3. Электрофорез ДНК *pBR322* (*E. coli* B834) и фага λ в 0,7 %-ном геле агарозы: 1—ДНК *pBR322*, обработанная *R·EcoRII*; 2—ДНК *pBR322*, обработанная рестриктазной активностью, выделенной из *A. tumefaciens* (штамм Bt); 4—ДНК фага λ , обработанная *R·EcoRII*; 5—ДНК фага λ , обработанная рестриктазной активностью, выделенной из *A. tumefaciens* (штамм Bt)

Fig. 3. 0.7 % agarose gel electrophoresis of *pBR322* and λ phage DNA: 1—DNA of *pBR322* digested by the restriction endonuclease *EcoRII*; 2—DNA of *pBR322* digested by the restriction endonuclease obtained from *Agrobacterium tumefaciens* (strain Bt); 4—DNA of λ phage digested by the restriction endonuclease *EcoRII*; 5—DNA of λ phage digested by the restriction endonuclease obtained from *Agrobacterium tumefaciens* (strain Bt)

Тот факт, что не только все октопиновые штаммы, но и излеченные авирулентные их производные содержат системы модификации-рестрикции *EcoRII*, свидетельствует о хромосомной природе этих признаков.

Нопалиновые штаммы агробактерий, их излеченные авирулентные производные, а также большинство естественных авирулентных штаммов агробактерий содержат иные, чем *EcoRII*, системы модификации-рестрикции. Так, известно, что в клетках штамма С58 обнаружена рестриктаза *AtuAI*, являющаяся изоизомером *R·BclI* [4].

Таким образом, наличие ДНК-метилазы со специфичностью $R \times EcoRII$ и соответствующей ей эндонуклеазы рестрикции является отличительной особенностью штаммов, содержащих *Ti*-плазмиды октопинового типа, а также авирулентных производных этих штаммов агробактерий.

SEARCH FOR THE MODIFICATION-RESTRICTION SYSTEMS IN AGROBACTERIA DNA

T. V. Stefanishina, I. G. Bogdarina, Ya. I. Buriyanov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

The DNA modification-restriction systems have been studied for their presence in 19 *Agrobacteria* strains, including the virulent ones with *Ti*-plasmids of various classes, the avirulent octopine and nopaline strain derivatives obtained by curing the *Agrobacteria* virulent strains from *Ti*-plasmids as well as natural isolates of avirulent *Agrobacteria*. It is shown that the presence of the DNA modification-restriction system with *EcoRII* specificity is a characteristic feature of the *Agrobacteria* octopine strains and of their cured avirulent derivatives. The *Agrobacteria* nopaline strains, their cured avirulent derivatives, and most of the *Agrobacteria* natural avirulent strains contain the DNA modification-restriction systems different from *EcoRII*. The chromosomal nature of these characters is shown.

1. Characterization of different plaque forming and defective temperature phages in *Agrobacterium* strains / G. Vervliet, M. Holsters, H. Teuchy et al. // J. Gen. Virol.— 1975.—26, N 1.— P. 33—48.

2. *Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis* / F. Casse, C. Boucher, J. S. Julliot et al. // *J. Gen. Microbiol.*— 1979.—113, N 2.— P. 229—242.
3. *Schleif R.* Assaying of organisms for the presence of restriction endonucleases // *Meth. Enzymol.*— 1980.—65.— P. 19—23.
4. *Roberts R. J.* Restriction and modification enzymes and their recognition sequences // *Nucl. Acids Res.*— 1985.—13.— Suppl.— P. 165—199.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино

Получено 21.04.86

УДК 547.963.3

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНФОРМЕРОВ ДЕАЦИЛИРОВАННОЙ тРНК С 80S РИБСОМАМИ

Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Неактивные в аминоацилировании конформеры тРНК выделены из печени кроликов при некоторых состояниях, связанных с изменением биосинтеза белка в организме [1—3]. Изучены активационные параметры их ренатурации *in vitro* [4] и особенности образования комплекса с лейцил-тРНК-синтетазой [5]. Целью настоящей работы было исследование взаимодействия указанных конформеров тРНК с рибосомами из печени кролика. Эта задача актуальна и интересна, поскольку особенности взаимодействия тРНК с эукариотическими рибосомами до настоящего времени изучены крайне мало. Кроме того, исследование связывания биологически неактивных конформеров тРНК с рибосомами может дать информацию о принципиальной возможности их ингибирующего действия на белковый синтез на этапе трансляции.

Препараты тРНК из печени голодавших 10—12 сут и контрольных кроликов получали, как описано ранее [5]. Суммарный препарат тРНК из печени голодавших животных содержит смесь активных и неактивных в аминоацилировании тРНК (тРНК_{а+н}), а из печени контрольных животных — активные конформеры (тРНК_а). Деацилирование тРНК проводили по методу [6]. 40S и 60S субчастицы рибосом из печени кролика получали, как описано в [7]. [¹⁴C]фенилаланил-тРНК с удельной активностью 1520 пмолей [¹⁴C]фенилаланина на 1 ед. А₂₆₀, обогащенная тРНК^{Phe} и суммарная тРНК, лишенная фенилаланиновой тРНК (тРНК^{-Phe}), были получены по методу [8]. Связывание аминоацил-тРНК с рибосомами изучали в системе, предложенной Ниренбергом и Ледером [9]. Смесь в объеме 50 мкл содержала 0,02 М трис-НСl, рН 7,6, 0,1 М NH₄Cl, 0,02 М MgCl₂, 5 пмолей 40S и 7,5 пмолей 60S субчастиц рибосом, 20 пмолей [¹⁴C]фенилаланил-тРНК, различные количества деацилированной тРНК и в ряде случаев 2 мкг поли(У). [¹⁴C]фенилаланил-тРНК добавляли после преинкубации смеси при 4 °С в течение 10 мин и затем инкубировали пробы еще 45—75 мин при той же температуре. Образовавшиеся комплексы сорбировали на нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Одним из способов исследования взаимодействия деацилированной тРНК с рибосомами является определение ее ингибиторного действия на связывание с рибосомами аминоацил- либо пептидил-тРНК [10, 11]. В настоящей работе взаимодействие рибосом с различными конформерами тРНК оценивали по степени ингибирования связывания [¹⁴C]фенилаланил-тРНК. Предварительно были определены оптимальные для матричнозависимого и безматричного связывания количества фенилаланил-тРНК и время инкубации.

На рис. 1, а представлены результаты исследования ингибирующего действия различных конформеров тРНК на поли(У)-зависимое связывание фенилаланил-тРНК с 80S рибосомами. Видно, что тРНК_{а+н}