



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32:577.11

ФИЗИЧЕСКАЯ КАРТА *Hind*III-ФРАГМЕНТА ПЛАЗМИД  
*HALOBACTERIUM HALOBIVM*

Патон Е. Б., Свердлов Е. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Галофильные бактерии, обитающие в среде с 20–30% содержанием NaCl, отличаются рядом уникальных свойств, одним из которых является наличие в них пурпурной мембраны, содержащей фоторецепторный белок — бактериородопсин [1]. Из полученных ранее экспериментальных данных следует, что гены, кодирующие синтез пурпурной мембраны, локализованы на плазмиде [2, 3]. Ранее описывалось выделение плазмид из пяти штаммов *H. halobium* [4, 5], включая и дефектный по синтезу бактериородопсина штамм *H. halobium* R<sub>1</sub>mR [6], *red*-мутант, и картирование этих плазмид с помощью различных эндонуклеаз рестрикции [5].

В результате электрофоретического анализа продуктов расщепления плазмидных ДНК эндонуклеазой рестрикции *Hind*III [5] было обнаружено, что все плазмиды из штаммов, синтезирующих бактериородопсин, в отличие от *H. halobium* R<sub>1</sub>mR содержат в своем составе фрагмент с *M* 4,35·10<sup>6</sup>. Из первичной структуры бактериоопсина [7] следует, что кодирующий этот белок ген, с учетом вырожденности генетического кода, не должен содержать мест узнавания рестриктазами *Hind*III и *Eco*RI, но может содержать один сайт узнавания *Bam*HI и *Pst*I, два сайта узнавания *Sal*I и три сайта узнавания *Pvu*II. Это позволило предположить, что по крайней мере вся структурная часть гена бактериоопсина может содержаться во фрагменте с *M* 4,35·10<sup>6</sup>.

Мы считали целесообразным провести дальнейший анализ этих фрагментов из плазмид *H. halobium* R<sub>1</sub> и дикого типа путем их картирования с использованием эндонуклеаз рестрикции *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I и *Pvu*II. Исследуемые *Hind*III-фрагменты плазмид *H. halobium* дикого типа и R<sub>1</sub> были протрансформированы в *E. coli* с помощью плазмиды pBR 322. Гибридные плазмиды из соответствующих клонов расщепляли эндонуклеазой рестрикции *Hind*III и необходимые фрагменты ДНК получали препаративным гель-электрофорезом.

Для рестрикции к 1 мкг фрагмента ДНК добавляли необходимое количество буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,4–7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит и 60 мМ NaCl (в случае расщепления рестриктазой *Pvu*II буфер не содержит NaCl) и 1–2 ед. акт. фермента. После 2-часовой инкубации при 37°С фермент инактивировали прогреванием в течение 10 мин при 65°С. Далее продукты расщепления анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (20 см×20 см×0,2 см) и в 6–8% полиакриламидном геле (20 см×20 см×0,15 см). Электрофорез проводили в буфере, содержащем 40 мМ трис-HCl, 20 мМ уксусную кислоту и 2 мМ EDTA, pH 7,9–8,2, при силе тока 30–50 мА.

Для картирования сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции на исследуемых фрагментах сравнивали продукты расщепления определенной рестриктазой изолированного фрагмента и фрагмента, находящегося в составе соответствующей гибридной плазмиды. Фрагменты, подвижность которых различалась при подобном анализе, являлись концевыми. Молекулярный вес образующихся при этом субфрагментов определяли

Картирование *Hind* III-фрагментов плазмид *H. halobium* дикого и R<sub>1</sub>-типов с использованием эндонуклеаз рестрикции

<i>Eco</i> RI		<i>Bam</i> HI		<i>Pst</i> II		<i>Pvu</i> II		<i>Sal</i> I	
субфрагмент	М·10 <sup>-6</sup>	субфрагмент	М·10 <sup>-6</sup>	субфрагмент	М·10 <sup>-6</sup>	субфрагмент	М·10 <sup>-6</sup>	субфрагмент	М·10 <sup>-6</sup>
<i>E</i> 1	2,8	<i>B</i> 1 *	2,79	<i>P</i> s1 *	1,92	<i>P</i> v1 *	3,73	<i>S</i> 1 *	2,87
<i>E</i> 2 *	1,28	<i>B</i> 2 *	1,56	<i>P</i> s2	1,4	<i>P</i> v2 *	0,33	<i>S</i> 2	0,62
<i>E</i> 3 *	0,27			<i>P</i> s3 *	1,02	<i>P</i> v3	0,27	<i>S</i> 3	0,51
								<i>S</i> 4 *	0,34

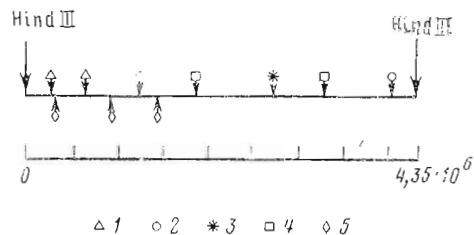
\* Субфрагменты, содержащие *Hind*III-концы исходного фрагмента.

путем сравнения их электрофоретической подвижности с подвижностью следующих реперных фрагментов ДНК: *Eco*RI- и *Bam*HI-фрагментов ДНК бактериофага λ [9], линейной формы плазмиды pBR 322 [10] и pBR 322, расщепленной *Bsp*I [10], *Eco*RI-фрагментов плазмиды pJC 703 [11].

В результате проведенного картирования было обнаружено, что расположение мест узнавания всех вышеуказанных рестриктаз одинаково для обоих исследуемых *Hind*III-фрагментов плазмид дикого и R<sub>1</sub>-типов. Данные о величине и порядке расположения фрагментов, образующихся в результате расщепления *Hind*III-фрагментов плазмид из *H. halobium* дикого типа и R<sub>1</sub>, приведены в таблице.

Для определения порядка расположения *Sal*I-субфрагментов *S*1 и *S*2 были использованы результаты расщепления исходных фрагментов эндонуклеазой *Eco*RI. Порядок расположения (рисунок) и размеры субфрагментов, образующихся при расщеплении исследуемых фрагментов рестриктазами *Eco*RI и *Sal*I, свидетельствуют о том, что один из сайтов *Eco*RI локализуется на *S*1-субфрагменте, а второй — на соседнем с ним субфрагменте (*S*2 или *S*3). После расщепления исходного фрагмента эндонуклеазой *Bam*HI был выделен субфрагмент *B*1, содержащий небольшой участок *S*1-субфрагмента и субфрагменты *S*2, *S*3 и *S*4. Сравнение продуктов одновременного расщепления субфрагмента *B*1 рестриктазами *Eco*RI и *Sal*I с продуктами расщепления этого же субфрагмента рестриктазой *Sal*I показало, что подвижность *S*4, *S*2 и небольшого участка *S*1-субфрагмента остается неизменной. Субфрагмент *S*3 расщепляется *Eco*RI на два новых фрагмента.

Физическая карта *Hind*III-фрагментов из плазмид *H. halobium*. Стрелками указаны места расщепления эндонуклеазами рестрикции: *Pvu*II (1), *Eco*RI (2), *Bam*HI (3), *Pst*I (4), *Sal*I (5)



Таким образом, суммируя данные, полученные при расщеплении *Hind*III-фрагментов плазмид *H. halobium* различными эндонуклеазами рестрикции, можно построить их физическую карту (рисунок) и сделать вывод, что структурная часть гена бактериоопсина может содержаться как в *E*1-, так и в *E*2-субфрагменте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baylay S. T., Morton R. A. Crit. Rev. Microbiol., 1978, v. 6, № 1, p. 151—205.
2. Weidinger G., Klotz G., Goebel W. Plasmid, 1979, v. 2, № 2, p. 377—386.
3. Pfeifer F., Weidinger G., Goebel W. J. Bacteriol., 1981, v. 145, № 1, p. 375—381.
4. Патон Е. В., Ходкова Е. М., Свердлов Е. Д. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1881—1883.
5. Патон Е. В., Ходкова Е. М., Гурьева И. М., Свердлов Е. Д. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1532—1537.

6. Matsuno-Yagi A., Mukohata Y. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 199, № 1, p. 297-303.
7. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Lett., 1979, v. 100, № 1, p. 219-224.
8. Патон Е. В., Ходкова Е. М., Сverdlov Е. Д. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1734-1736.
9. Roberts R. J. Gene, 1978, v. 4, № 3, p. 183-193.
10. Sutcliff J. G. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 8, p. 2721-2728.
11. Collins J. Mol. gen. Genet., 1979, v. 173, № 1, p. 217-220.

Поступило в редакцию  
13.X.1981

## PHYSICAL MAP OF THE *Hind*III FRAGMENTS FROM *H. HALOBIIUM* PLASMIDS

PATON E. B., SVERDLOV E. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Physical map of the 4,35 Md *Hind*III fragments from *H. halobium* wild type and *H. halobium* R<sub>1</sub> strain plasmids was constructed using restriction endonuclease analysis. Fragments were cleaved by *Bam*HI, *Eco*RI, *Sal*I, *Pst*II and *Pvu*II.