

УДК 575.114.4

Н. Г. АЗАРЯН

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ НЕСОВМЕСТИМОСТИ (*inc*) ПЛАЗМИДЫ R906

Локализация генов несовместимости (*inc*) на карте плазмиды R906 осуществлена на основании проявления P-1 специфичной несовместимости ее различными делеционными и рекомбинантными производными. Анализ кинетики сегрегации этих плазмид при их совмещении в одной клетке в результате реципрокной трансформации или конъюгации с IncP-1 плазмидами R751 и R702 позволил точно картировать *inc* гены на ДНК R906.

Сопоставление полученных данных с рестрикционными картами производных плазмид позволило локализовать *inc* гены на участке ДНК с координатами 24,6–25,7 тысяч пар оснований (т.п.о.).

Успехи молекулярной биологии во многом обусловлены разработкой и конструированием все более совершенных векторных молекул, способных реплицироваться в различных бактериях-хозяевах, что позволяет изучать экспрессию клонированных генов в этих организмах [1, 2].

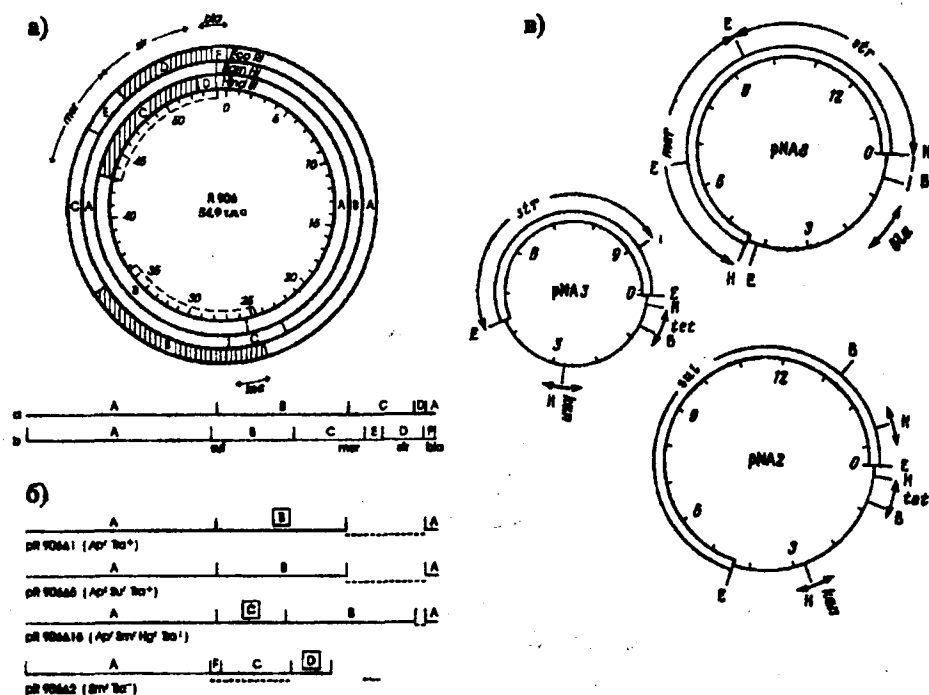
Плазмиды P-1 группы несовместимости уникальны по способности определять собственный конъюгационный перенос в филогенетически отдаленные виды грамотрицательных бактерий. Генетическое картирование их жизненно важных генов, к которым относятся гены репликации и связанные с ними гены, ответственные за феномен несовместимости, отражающий невозможность сосуществования в одной клетке двух родственных плазмид [3], позволит сконструировать на основе P-1 плазмид векторные молекулы, способные преодолевать защитные барьеры отдаленных видов.

Целью настоящей работы являлось изучение несовместимости, проявляемой различными делеционными и рекомбинантными производными IncP-1 плазмиды R906 (Ap Sm Su Hg) [4] по отношению к родственным репликонам – Inc P-1 плазмидам R702(Km Tc Sm Su) и R751(Tp) – и картирование *inc* генов.

Наличие генов несовместимости *inc* в производных плазмиды R906 проявлялось при изучении кинетики сегрегации таковых с Inc P-1 плазмидами R702 и R751 при их совмещении в трансформантах, отобранных на селективных средах, содержащих 2 антибиотика, устойчивость к которым определяли донорная и резидентная плазмиды.

Полученные результаты показали, что делеционные производные pR906Δ1, pR906Δ2, pR906Δ5, pR906Δ18 проявляют разную степень несов-

местимости. Наибольшую – pR906Δ5 плазида, которая отличается от pR906Δ1 только инверсией Hind-111-C фрагмента [3], что понижает степень несовместимости. Это указывает на расположение генов *inc* в районе Hind-111 сайта с координатами 25,7 т.п.о., который разделяет два Hind-111 фрагмента (см. рисунок).



Физическая и генетическая карты плазмиды R906 (а), ее делеционных (б) и рекомбинантных (в) производных. На карте плазмиды R906 заштрихованы клонированные участки ДНК, пунктиром отмечены делетированные фрагменты.

Делеционный мутант pR906Δ18 проявляет такую же несовместимость, как и pR906Δ1, но отличается от нее длиной молекулы, составом и расположением Hind-111 фрагментов. Внедрение Hind-111-C фрагмента между Hind-111-A и Hind-111-B также прерывает последовательность нуклеотидов в районе 25,7 т.п.о. Наименьшую степень несовместимости проявляет делеционная плазида pR906Δ2, у которой отсутствует EcoR-B фрагмент, перекрывающий Hind-111-B фрагмент, в частности в области 25,7 т.п.о.

Сравнение рестрикционных карт показывает, что мутантные плазмиды pR906Δ1, pR906Δ5 и pR906Δ2 имеют общие участки ДНК родительской плазмиды с координатами 0–24,6 т.п.о. и 35,7–42,4 т.п.о. Потеря в плазмиде pR906Δ2 участка 24,6–25,2 т.п.о. приводит к отсутствию проявления несовместимости, что позволяет локализовать *inc* гены в данном районе.

Для проверки этого исследовали проявление Р-1 специфической несовместимости рекомбинантными производными плазмиды R906 – pNA2, pNA3, pNA8, которые содержат различные рестрикционные фрагменты, клонированные в составе плазмид pTK16 и pBR322 [4] (см. рисунок).

Плазмиды pNA8 и pNA2 не проявляют P-1 специфической несовместимости, т.е. на клонированных в их составе Hind-III-C и EcoR-D фрагментах соответственно отсутствуют гены inc. Зато рекомбинантная плаزمида pNA3, содержащая EcoRI фрагмент, проявляет высокую степень несовместимости. Значит, гены inc можно локализовать в районе ДНК плазмиды R906, имеющей координаты 24,6–25,7 т.п.о.

Кафедра генетики и цитологии

Поступило 13.04.2004

ЛИТЕРАТУРА

1. Olsen R.H., Debusscher G., McCombie W.R. – J. Bacteriol., 1982, v. 150, № 1, p. 60.
2. Cohen S.N. – J. Science, 1997, v. 275, p.769.
3. Cabello F., Timmis K., Cohen S.N. – Nature, 1976, v. 259, p. 285–290.
4. Саканян В., Азарян Н., Крупенко М. – Мол. биол., 1985, т. 19, № 4, с. 964–973.

Ն. Հ. ԱԶԱՐՅԱՆ

R906 ՊԼԱԶՄԻԴԻ ԱՆՀԱՍՏԵՂԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ԳԵՆԵՐԻ (inc) ԲԱՐՏԵԶԱՎՈՐՈՒՄ

Ամփոփում

Հիմնվելով R906 պլազմիդի դելեցիոն և ռեկոմբինացիոն ածանցյալների P-1 սպեցիֆիկ անհամատեղելիության դրսևորման վրա՝ անհամատեղելիության inc գեները տեղայնացրել ենք գենետիկական քարտեզի վրա: Դա կատարվել է վերոհիշյալ ածանցյալների և Inc P-1 R751 և R702 պլազմիդների ռեցիպրոկ տրանսֆորմացիայի և կոնյուգացիայի արդյունքում սեգրեգացիայի կինետիկայի վերլուծությամբ:

Ստացված տվյալների համադրմը ածանցյալ պլազմիդների ռեստրիկցիոն քարտեզների հետ թույլ տվեց տեղայնացնել inc գեները ԴՆԹ-ի 24,6–25,7 հազար գույգ մուկլետոսիդների տիրույթում:

N. G. AZARYAN

MAPPING OF GENES INCOMPATIBILITY (inc) OF THE R906 PLASMIDE

Summary

Localization of genes incompatibility (inc) on the DNA R906 plasmide map is fulfilled through revelation of P-1 specific incompatibility by various deletion and recombination derivatives of R906 plasmide. It has been carried out by the analyses of segregation kinetics in the case of combining the above mentioned derivatives in a cell as a result of their reciprocal transformation or conjugation with Inc P-1 plasmides R751 and R702.

It has become possible to localize inc genes on the DNA sector with 24,6–25,7kb coordinates comparing the received data with the restriction maps of the derivatives of R906 plasmide.