



УДК 547.963.32.02+577.11

ПЛАЗМИДЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ *H. HALOBIVM*

Патон Е. Б., Ходкова Е. М., Свердлов Е. Д.

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

Галофильные бактерии представляют собой одну из разновидностей организмов, существующих в экстремальных условиях (20–30% NaCl). Сопоставление закономерностей реализации генетической информации в этих бактериях и в организмах, существующих в обычных условиях, должно в значительной степени углубить понимание молекулярных основ жизнедеятельности. Одной из интересных особенностей галофильных бактерий является наличие в их мембранах фоторецепторного белка — бактериородопсина [1]. Генетическая информация для синтеза этого белка, возможно, закодирована в плазидах (В. Гёбель, ФРГ, персональное сообщение), так же как информация для синтеза других компонентов мембран — газовых вакуолей [2, 3].

В настоящей работе с целью изучения генетической регуляции биосинтеза бактериородопсина были выделены и охарактеризованы плазмиды из разных штаммов *H. halobium*: штамма дикого типа, штамма R<sub>1</sub> (дефектного по газовым вакуолям) [4] и штамма *red* (дефектного по синтезу бактериородопсина) [5].

Синтез бактериородопсина *in vivo* в штаммах *H. halobium* исследовали следующим образом [6]: клетки различных штаммов после 3 сут роста с аэрацией собирали центрифугированием, ресуспендировали в равном объеме солевого раствора (250 г/л NaCl, 20 г/л MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 г/л KCl и 0,5% L-аланина) и инкубировали 3 ч при 38° С с аэрацией для истощения внутриклеточного пула аминокислот. Аликвоту (10 мл) полученной суспензии центрифугировали и клетки ресуспендировали в 400 мкл солевого раствора, содержащего 400 мкг/мл этидиумбромида. После 15–60 мин инкубации с аэрацией и при освещении добавляли 10 мкКи [<sup>35</sup>S]метионина (1200 Ки/ммоль). Для остановки включения радиоактивности к суспензии добавляли 5 мл солевого раствора, охлажденного до –20° С, и клетки осаждали центрифугированием.

После освобождения от избытка [<sup>35</sup>S]метионина двукратной промывкой солевым раствором при –20° С клетки лизировали, добавляя 400 мкл 10 мМ раствора MgCl<sub>2</sub>, содержащего 10 мкг/мл дезоксирибонуклеазы. Мембранную фракцию осаждали центрифугированием в течение 3 ч при 150 000g в роторе SW50×1 после наслаивания 400 мкл лизата на 4,5 мл 20% раствора сахарозы в 50 мМ трис-НСl, рН 7,5. Осадки растворяли в 40–80 мкл буфера для электрофореза, содержащего 6 г/л трис-НСl (рН 8,3), 3 г/л борной кислоты, 0,37 г/л EDTA, 0,1% додецилсульфата натрия. и 10–20 мкл раствора анализировали электрофорезом в 10% полиакрил-

Сравнение результатов расщепления плазмид из штаммов *H. halobium* R<sub>1</sub> и *red* рестрикционными эндонуклеазами *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*  
Приведена молекулярная масса фрагментов, М · 10<sup>-6</sup>

Фрагмент	<i>EcoRI</i>		<i>BamHI</i>		<i>HindIII</i>		<i>PstI</i>	
	RI	<i>red</i>	RI	<i>red</i>	RI	<i>red</i>	RI	<i>red</i>
A	5,2	10,7	6,7	~17	~18	~18	5,9	~19
B	2,5	6,9	5,5	16,2	4,2	11,3	4,8	11,6
C	2,4	5,6	5,0	8,8		9,1	4,1	6,0
D	2,2	5,0	2,6	7,7		6,7	2,0	5,4
E	2,1	4,9	2,5	5,2		6,2	1,7	5,0
F	1,6	4,5	2,3	4,9		4,2	1,3	4,2
G	1,2	3,0		3,7		2,5	1,0	4,1
H	1,1	2,8		3,1		2,2		3,5
I	0,9	2,7		2,6		1,3		2,5
J	0,7	2,5						1,9
K	0,6	2,3						1,5
L	0,5	2,1						1,1
M		1,9						1,0
N		1,5						0,7
O		1,2						0,6
P		1,1						
Q		0,9						
R		0,8						
S		0,7						

амидном геле. Для локализации белков гели окрашивали кумасси голубым. Распределение радиоактивных белков в геле определяли радиоавтографией после его высушивания в вакууме. В качестве контроля в каждом случае использовали клетки, обработанные аналогично, но без этидиумбромидом.

Было показано, что в случае штаммов, продуцирующих бактериородопсин, присутствие этидиумбромидом в процессе инкубации уменьшало количество всех [<sup>35</sup>S]меченых белков, причем синтез бактериородопсина ингибировался в наименьшей степени. В штамме *red* не было обнаружено белков с подвижностью, соответствующей бактериородопсину.

Выделение плазмид из клеток *H. halobium* проводили модифицированным нами щелочным методом [7]: для этого 5 г клеток в стационарной фазе роста ресуспендировали в 20 мл солевого раствора и добавляли равный объем раствора, содержащего 100 мМ глюкозу, 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, и 20 мМ EDTA. После инкубации в течение 30 мин при 0° С к смеси добавляли 2 объема 0,2 М NaOH, содержащего 1% додецилсульфата натрия, и выдерживали при 0° С. Раствор нейтрализовали добавлением 1,5 объемов 3 М ацетата натрия, рН 4,85. После 660 мин инкубации при 0° С раствор осветляли центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 мин. ДНК плазмид осаждали из супернатанта, добавляя твердый полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000) до конечной концентрации 10% и инкубируя ночь при 4° С. Окончательную очистку плазмидной ДНК осуществляли равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl с этидиумбромидом [8].

ДНК плазмид из разных штаммов *H. halobium* были охарактеризованы по электрофоретической подвижности в агарозном геле и, кроме того, методом электронной микроскопии. Был проведен также рестрикционный анализ этих плазмид с использованием различных эндонуклеаз рестрикции: *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *Sall*.

В результате проведенного анализа было показано, что плазмиды из штамма дикого типа сходна с плазмидой из штамма R<sub>1</sub> как по молекулярному весу (25 · 10<sup>6</sup>), так и по картине рестрикционного расщепления, тогда как плазмиды из штамма *red* (дефектного по синтезу бактериородопси-

на) имеет значительно больший молекулярный вес ( $70 \cdot 10^6$ ) и иную картину рестрикционного расщепления. Данные рестрикционного анализа из штаммов *H. halobium* R, и *H. halobium red* приведены в таблице.

Таким образом, плазмиды из штаммов, продуцирующих бактериородопсин, отличаются от плазмиды, содержащейся в штамме, дефектном по синтезу бактериородопсина.

Следует отметить, что нам не удалось обнаружить в *H. halobium* плазмиды с молекулярным весом  $100 \cdot 10^6$ , описанной Гебелем [3]. Причины этого неясны.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bayley S. T., Morton R. A. (1978) Crit. Rev. Microbiol., 6, 151–205.
2. Simon R. D. (1978) Nature, 273, 314–317.
3. Weidinger J., Klotz J., Goebel W. (1979) Plasmid, 2, 377–386.
4. Stoeckenius W., Kunau W. H. (1968) J. Cell. Biol., 38, 337.
5. Matsuno-Jadi A., Mukohata J. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 78, 237–243.
6. Sumper M., Herrmann J. (1978) Eur. J. Biochem., 89, 229–236.
7. Birnboim H. C., Doly J. (1979) Nucl. Acids Res., 7, 1513–1522.
8. Clewell H. D. H., Helinski D. R. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 1159–1166.

Поступило в редакцию  
4.VIII.1980

#### PLASMIDS FROM DIFFERENT STRAINS OF *H. HALOBIUM*

PATON E. B., KHODKOVA E. M., SVERDLOV E. D.

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

The plasmids from different *Halobacterium halobium* strains were isolated. A red mutant of the bacterium which is unable to synthesize bacteriorhodopsin was shown to contain a plasmid different from those isolated from wild and R<sub>1</sub> strains. The comparison was based on molecular weight determination and on cleavage with restriction endonucleases *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* and *PstI*.