

Б. П. КАРАБЕКОВ, М. Г. ОГАНЕСЯН

ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ПО МОРФОЛОГИИ КОЛОНИЙ У ФАГА T5h

Среди мутантов фагов с измененной морфологией колоний наиболее известны г-мутанты Т-четных фагов [11], отличающиеся более крупными размерами пятен на газоне *E. coli* В. Колонии, образуемые этими мутантами, имеют четко очерченные края без зоны подавленного лизиса вокруг [1, 4, 5, 9]. Мутанты г, в особенности гII-мутанты, фагов T2 и T4 были объектами многих генетических и биохимических исследований. Установлено, что г-мутация, по-видимому, связана с нарушением одной из ранних функций [3], в результате чего происходит быстрый лизис инфицированных клеток (г—от английского rapid lysis), что и обуславливает вышеописанную морфологию колоний этих мутантов. Кроме характерной морфологии пятен на разных штаммах *E. coli*, мутанты гII отличаются от мутантов гI и гIII, а также от фагов дикого типа, утратой способности роста на штамме *E. coli* K12, лизогенном по фагу λ [6]. Однако причины ингибирования роста гII-мутантов Т-четных фагов в лизогенных по λ клетках штамма K12 не были выяснены.

Было показано [12], что подавление роста гII-фагов контролируется специальным геном *gex* у фага λ , расположенного между генами N и C₁ на генетической карте фага λ .

В доступной нам литературе мы не нашли сведений о мутациях типа г у Т-нечетных фагов, в частности, у фага T5.

В настоящей работе описываются спонтанные мутанты по морфологии колоний фага T5h, напоминающие г-мутанты Т-четных фагов.

Материал и методы. В работе использованы следующие штаммы бактерий: *Escherichia coli* K12 (λ), S и BB; фажорезистентные мутанты *E. coli*—B/1,5; K/5; S/5; B/2 и B/4.

Использованы фаги T5h⁺, его мутанты по спектру литической активности (T5h), полученные в нашей лаборатории [2], а также штаммы фагов λ и λ_{11} . Применялись общие методы исследования для бактериофагов, описанные Адамсом [1]. Процедура определения относительной эффективности посева фагов (ОЭП) на бактериальном хозяине проводилась по методике, описанной в работе Эскридж и др. [10].

Для обозначения вариантов фагов мы пользовались сокращенной номенклатурой Бертани и Вейгла [8], согласно которой после названия фага дается название штамма бактерий, на котором этот фаг был продуцирован (например, T5h В обозначает, что препарат фага получен на бактериальном хозяине *E. coli* В).

Мутанты по морфологии колоний, выделенные из препаратов фагов T5h, мы обозначили символом аг (сокращенное: аналог г), подчеркнув этим их сходство с г-мутан-

тами T-четных фагов. Так как эти мутации получены у h-мутанта фага T5, то полностью они обозначены T5har, в отличие от дикого типа фага T5h⁺, обозначенного нами T5h⁺ar⁺.

В отличие от лизогенного штамма *E. coli* K12 (λ), штамм *E. coli* K12 λ^s , являющийся нелизогенным, чувствительным к фагу λ штаммом K12, обозначался *E. coli* S.

Результаты. В ходе экспериментов с фагом T5h нами было замечено, что, наряду с колониями нормальной морфологии, на газоне *E. coli* В препараты этого фага образуют еще единичные, морфологически резко отличающиеся от стандартных, колонии. На 10^{10} частиц фага T5h, образующих нормальные колонии, приходилось около 10^8 , образующих морфологически отличающиеся колонии.

Это крупные, размером 2—2,5 мм в диаметре, круглые негативные колонии, совершенно прозрачные, с четко очерченными краями без мутного ореола, внешне очень напоминающие колонии г-типа фагов T2 или T4 (рис. 1, а). Фенотипическое сходство с г-колониями фагов T2 и T4

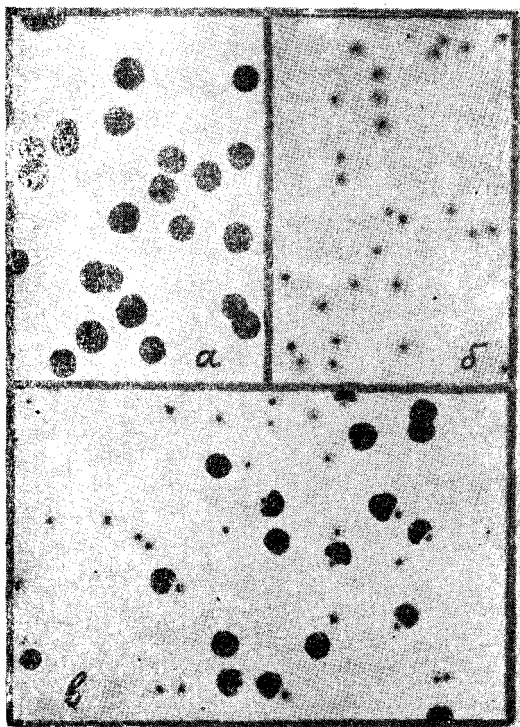


Рис. 1. а — колонии мутанта T5har на газоне штамма *E. coli* B/1,5. б — стандартные колонии фага T5h на газоне того же штамма. в — смешанное заражение *E. coli* B/1,5 фагами T5h⁺ и T5har; видно подавление аг-колоний фагами стандартного аг⁺ — типа.

усиливалось еще и тем, что при близком соседстве с колониями фага T5, имеющими нормальные размеры и морфологию, края крупных г-подобных колоний оказывались срезанными или вдавленными (рис. 1, в). Это создавало впечатление, что крупные колонии действительно не имеют зоны подавленного лизиса. Постоянство, с которым эти мутант-

ные типы колоний выделялись из различных препаратов фага T5h, говорило о закономерном характере появления их. Специальная проверка, проведенная с целью выделения таких же морфологически измененных колоний из препаратов фага T5h⁺, дала отрицательные результаты.

Фаги из упомянутых мутантных колоний лизировали штаммы *E. coli* B/1,5, B/2 и B/4. Относительная эффективность посева их на указанных хозяевах составляла 1,0. Для изучения природы этих морфологически измененных колоний было отобрано 23 независимо выделенных аг-мутанта. Клонирование мутантных фагов проводилось на клетках *E. coli* B/1,5. Препараты, полученные после такого клонирования, были отмечены как T5har. B/1,5.

С целью характеристики поведения мутантов T5har препараты T5har. B/1,5 одновременно титровались для определения ОЭП на различных штаммах *E. coli* (табл. 1).

Таблица 1

ОЭП фага T5har на различных штаммах *E. coli*

Фаг	ОЭП на хозяине			
	Штаммы <i>E. coli</i>			
	B/1,5	K12 (λ)	S	B
T5har. B/1,5	1,0	10^{-4}	1,0	1,0
T5har ⁺ . B/1,5	1,0	1,0	1,0	1,0

Как показано в табл. 1, мутант аг испытывает ограничение на штамме K12 (λ). Этим свойством родительский тип фага (T5har⁺) не обладает, оно, по-видимому, связано с новой мутацией, приведшей к изменению морфологии колонии фага. Для выяснения этого вопроса был проведен следующий опыт. С одной стороны, было исследовано поведение всех 23 независимо выделенных T5har мутантов на штамме *E. coli* K12 (λ), а с другой—все 23 мутанта были продуцированы на различных штаммах *E. coli* и проведено определение их ОЭП на тех же штаммах. Варианты фага T5har. K были получены из немногочисленных колоний, образуемых этим мутантом на штамме *E. coli* K12 (λ). Результаты исследований показали, что все исследованные мутанты T5har обладают общим свойством проявлять низкую ОЭП (не выше 10^{-4}) на штамме *E. coli* K12 (λ), с образованием на последнем колоний дикого типа — T5har⁺. (рис. 1, б). Из табл. 2 видно, что все препараты фага T5har, независимо от того, на каком хозяине получены (за исключением штаммов K12 (λ) и K12 (λ)/5), растут на штамме *E. coli* K12 (λ) с низкой ОЭП, причем образующиеся на этом хозяине немногочисленные колонии фага имеют дикий фенотип (аг⁺). Примечательно и то, что аналогичным образом ведет себя и вариант фага T5har. S, т. е. фаг T5har, выращенный на штамме, отличающемся от штамма K12 (λ) только нелизогенностью

но фагу λ . Хотя мутант T5hag на штамме S образует колонии дикого фенотипа, однако фаг, полученный из этих колоний, на *E. coli* B вновь формирует колонии мутантного типа.

Несмотря на то, что фаги, полученные из колоний, сформированных мутантом ag на штаммах K12 и K/5 (варианты фагов T5hag. K и T5hag. K/5), растут с одинаковой эффективностью (ОЭП=1,0) на всех штаммах *E. coli*, это не следует, по-видимому, связывать с модификацией фага в результате развития в клетках штаммов K и K/5, так как, во-первых, они образуют на этих штаммах только колонии дикого типа и, во-вторых, вариант фага T5hag. K, пройдя один цикл развития на *E. coli* B/1,5, уже не ограничивается штаммом K. Это наводит на мысль, что способностью формировать колонии на штамме K обладают только ревертанты T5hag⁺, тогда как сам мутант T5hag на этом штамме не растет. Учитывая то обстоятельство, что мутант ag на штамме *E. coli* S растет с ОЭП=1,0, можно было бы предположить, что отсутствие роста на штамме K связано с наличием профага λ . Для проверки этого предположения штамм *E. coli* S специально лизогенизировался бактериофагом λ , индуцированным из штамма *E. coli* K12 (λ) облучением ультрафиолетовыми лучами, а также фагом λ_{11} . Полученные таким образом лизогенные культуры штамма S были обозначены S (λ) и S (λ_{11}). Затем определялась относительная эффективность посева вариантов мутантного фага T5hag как на лизогенных, так и на нелизогенных культурах штамма S. При этом обращалось внимание на проявление фенотипа колоний мутантов T5hag. Полученные результаты суммированы в табл. 3, из которой видно, что во всех случаях мутант T5hag проявлял низкую эффективность посева только на штаммах, лизогенных по фагу λ , причем немногочисленные колонии, образующиеся на газоне этих штаммов, имели дикий фенотип ag⁺. Аналогичные результаты были получены со всеми независимо выделенными мутантами T5hag.

Таблица 2

Поведение вариантов фага T5hag на различных бактериальных хозяевах

Вариант фага	Штаммы <i>Escherichia coli</i>					
	B/1,5		K12 (λ)		S	
	ЭОП	фенотип колоний	ЭОП	фенотип колоний	ЭОП	фенотип колоний
T5hag. B/1,5	1,0	ag	10 ⁻⁴	ag ⁺	1,0	ag ⁺
T5hag. BB	1,0	ag	10 ⁻⁴	ag ⁺	1,0	ag ⁺
T5hag. S	1,0	ag	10 ⁻⁴	ag ⁺	1,0	ag ⁺
T5hag. K	1,0	ag ⁺	1,0	ag ⁺	1,0	ag ⁺
T5hag. K/5	1,0	ag ⁺	1,0	ag ⁺	1,0	ag ⁺

Таблица 3

Поведение мутантов T5har на лизогенных и нелизогенных по фагу λ штаммах E. coli

Фаг	Характеристики роста на бактериальном хозяине					
	S		S (λ) и S (λ_{11})		K12 (λ)	
	ОЭП	фенотип колоний	ОЭП	фенотип колоний	ОЭП	фенотип колоний
T5har. B/1,5	1,0	ar ⁺	10 ⁻⁴	ar ⁺	10 ⁻⁴	ar ⁺
T5har. S	1,0	ar ⁺	10 ⁻⁴	ar ⁺	10 ⁻⁴	ar ⁺
T5har. S (λ)	1,0	ar ⁺	1,0	ar ⁺	1,0	ar ⁺
T5har. K	1,0	ar ⁺	1,0	ar ⁺	1,0	ar ⁺

Таблица 4

Сводные данные о поведении фага дикого типа T5h⁺ar⁺ и его мутантов на разных бактериальных хозяевах

Фаг	Escherichia coli					
	B/1,5		K12 (λ)		S	
	ОЭП	фенотип колоний	ОЭП	фенотип колоний	ОЭП*	фенотип колоний
T5h ⁺ ar ⁺	0	—	1,0	дикий	1,0	дикий
T5h ar ⁺	1,0	дикий	1,0	дикий	1,0	дикий
T5h ar	1,0	ar	10 ⁻⁴	дикий	1,0	дикий

* ОЭП=10⁻⁴ обеспечивается за счет ревертантов T5.

В заключение приводим сводную таблицу (табл. 4), отражающую поведение фага T5 дикого типа и его h- и har-мутантов, а также таблицу (табл. 5), где сравнивается фенотип T5har-мутантов с фенотипом г-мутантов фага T4. Данные об г-мутантах фага T4 взяты из работы Бензера [7].

Таблица 5

Сравнительные данные по фенотипу ar-мутантов фага T5h и г-мутантов фага T4

Фаг	Штаммы E. coli		
	B	S	K12 (λ)
T4rI	г	г	г
T4rIII	г	дикий	дикий
T4rII	г	дикий	—
T5har	г	дикий	—

Обсуждение. В препаратах фага T5h появляются мутантные частицы, образующие на газоне штамма *E. coli* B/1,5 измененные по морфологии колонии. Такие колонии фенотипически сходны с колониями типа г T-четных фагов. Все полученные мутанты сохранили одновременно и родительский признак h.

Мутация аг приводит к утрате способности роста фага на штамме *E. coli* K12(λ), и это связано с ингибирующим действием профага λ . Последнее обстоятельство значительно усиливает сходство мутантов T5hag с гII-мутантами T-четных фагов. Сходство фенотипа мутантов T5hag и гII-мутантов фага T4 (табл. 5), а также исключение их профагом λ , дает основание думать, что мутанты аг, возможно, являются аналогами гII-мутантов T-четных фагов у фага T5.

Интересно отметить, что из 23 проверенных T5hag-мутантов все напоминали тип гII и не было мутантов типа гI и гIII. Этот факт может иметь три объяснения:

а) возможно, мы имели дело с клонированием предшествующего мутанта; б) у фага T5 аналоги гI- и гIII-генов мутируют значительно реже, чем аналог гII-гена (в этом случае они могут быть обнаружены при проверке значительно большего числа аг-мутантов); в) у фага T5 мутации типа гI и гIII отсутствуют вовсе.

Первое объяснение в нашем случае исключается, так как все штоки фагов T5h, из которых выделены мутанты аг, получены после многократного клонирования на разных штаммах *E. coli*. Более того, аг-мутанты выделены из препаратов разных T5h-фагов. Выбор между двумя последними объяснениями требует специальных экспериментов с привлечением значительно большего числа аг-мутантов. Здесь мы хотели бы специально подчеркнуть, что мутанты типа аг получены нами только из T5h-фагов (с частотой около 10^{-2} — 10^{-4}), тогда как при проверке более чем 10^6 фагов T5h⁺ ни одного мутанта аг-типа не было обнаружено. Следовательно, можно предположить наличие какой-то связи между h- и аг-типами мутаций у фага T5.

Институт экспериментальной биологии

АН АрмССР

Поступило 23.VII 1969 г.

Բ. Պ. ԿԱՐԱՔԵԿՈՎ, Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԳԱՂՈՒԹՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՎԱԾ ՄՈՐՖՈԼՈԳԻԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ T5h ԲԱԿՏԵՐԻՈՅԱԳԻ ՄՈՏ

Ա. մ. փ. n. փ. n. i. մ

Նկարագրված են T5h ֆագի սպորնտան մուտանտները, որոնք *E. coli* B շտամի վրա առաջացնում են խոշոր նեղատիվ գաղութներ: Այդ տիպի գաղութներն ունեն լավ արտահայտված սահմաններ, գաղութների շուրջը չի նկատվում ձնշված լիզիսի շրջան: Իրենց արտաքին տեսքով այդ գաղութները հի-

շեցնում են Դ-գույգ ֆագերի լավ հայտնի Դ-մուտանտներին, այդ իսկ պատճառով նրանք կոչվել են աԴ-մուտանտներ (Դ-ի անալոգ բառերից):

Այդ մուտանտները անջատվել են T5h ֆագի տարբեր պրեպարատներից 10^{-2} — 10^{-4} հաճախականությամբ: Մուտանտները, բացի գաղութների ձևից, ծնողական տիպի ֆագից տարբերվում են նաև նրանով, որ կորցրել են E. coli K12 (λ) շտամի վրա աճելու ընդունակությունը: Այդ շտամի վրա աԴ մուտանտների ցանքի հարաբերական էֆեկտիվությունը կազմել է 10^{-4} . E. coli K շտամի վրա աճելու հատկության այդ կորուստը պայմանավորված է բակտերիալ բջիջների մեջ (λ) պրոֆագի առկայությամբ:

T5har մուտանտների այն սակավաթիվ գաղութները, որոնք առաջանում են E. coli K12 (λ) շտամի գաղտնի վրա, պարունակում են միայն T5har + ֆագի մասնիկներ: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս մտածելու, որ T5h ֆագից անջատված աԴ մուտանտները, ըստ երևույթին, հանդիսանում են rII տիպի մուտանտներ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги. М., ИЛ., 1961.
2. Կարաբեկով Բ. Ս., Օգանյան Մ. Գ., Айрумян Б. А. Матер.-лы Второй научн. конф. Института экспер. биологии АН АрмССР, Ереван, 1968.
3. Крылов В. Н. Генетика, 2, 1967.
4. Стент Г. Молекулярная биология вирусов бактерий, М., Мир, 1965.
5. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов. М., Мир, 1965.
6. Benzer S. Proc. Natl. Acad. Sci. Wash., 41, 344. 1955.
7. Benzer S. The elementary units of heredity. In: The Chemical Basis of Heredity (eds. McElroy W. D. and Glass B.), Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957.
8. Bertani G., Weigle J. J. Bact., 65:113—121, 1953.
9. Doerman A. H. J. Bact. 55, 257, 1948.
10. Eskridge R., Weinfeld H., Paigen K. J. Bact., 93, 3, 835—844, 1967.
11. Hershey A. D. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 2, 67, 1946.
12. Howard B. D. Science, 158, 1588, 1967.