

М. Г. ОГАНЕСЯН, И. Н. БАРЕГАМЯН

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТРЕПТОМИЦИНОВЫХ МУТАЦИЙ У РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI K12

Получены стрептомицинрезистентные и стрептомицинзависимые мутанты у различных штаммов *E. coli*. Обнаружена низкая частота их появления по сравнению с другими типами мутаций. При проверке способности мутантов расти на минимальной и полноценной средах, а также супрессировать нонсенс мутации фага T4В выявлено, что мутации к стрептомицинрезистентности и стрептомицинзависимости имеют плеiotропное проявление, по-видимому, в результате изменений белков клетки.

Природные штаммы *E. coli* чувствительны к очень низким дозам стрептомицина (3—6 мкг/мл). Однако из естественных и мутагенно-обработанных расщепов *E. coli* можно выделить мутанты, которые в отличие от клеток дикого типа растут при наличии в инкубационных средах 1000 мкг/мл стрептомицина (СМ) и больше. Более того, обнаруживаются мутанты, которые утрачивают способность роста, если в инкубационных средах стрептомицин отсутствует.

По отношению к СМ бактериальные клетки подразделяются на три типа: стрептомицинчувствительные (СМ-ч), стрептомицинрезистентные (СМ-р) и стрептомицинзависимые (СМ-з). Эти типы являются результатом мутаций и детерминируются *Str A* локусом, расположенным на 64 мин хромосомной карты *E. coli* K12 [17]. Этот локус у *E. coli* определяет структуру S12 белка 30S субчастицы рибосом [12, 15, 18].

Так как рибосома является одним из главных компонентов белок-синтезирующего аппарата клетки, то можно предположить, что мутации в рибосомных белках могут привести к изменению характера синтеза белка. Такие изменения приводят к изменениям ряда свойств мутантной клетки [3, 4, 7, 10, 11].

Задачей настоящей работы было получить стрептомициновые мутации у различных штаммов *E. coli* и определить изменения в свойствах полученных мутантов.

Материал и методика. Бактериальные штаммы. В работе использованы бактерии, характеристики которых даны в табл. 1.

Фаги. Характеристики фагов, использованных в работе, даны в табл. 2.

Среды. Используются следующие среды: жидкая и агаризованная среды М9+10 мкг/мл тиамина [1], индикаторная среда Эндо (производство Дагестанского НИИ питательных сред) и общепринятые питательные среды—мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА).

Характеристика штаммов *E. coli* K12, использованных в работе

Таблица 1

Наименование бактериального штамма	Генотип*				Фенотип за счет супрессии lac
	lac i	lac Z	Sup	B ₁	
CA154	—	—	+	—	—
CA165	—	—	B	—	—
CA167	—	—	C	—	+
CA266	+	—	D	—	+
CA180	+	—	E	—	+
CA265	+	—	F	—	+
CA70	+	—	опал	+	+
FIY	+	—	опал	+	+

* — обозначения генов приводятся по хромосомной карте *E. coli* K12 Тейлора и Троггера [17].

Характеристика амберных фагов, использованных в работе

Таблица 2

Наименование мутантных фагов	Чувствительность к супрессорам	Наименование мутантных фагов	Чувствительность к супрессорам
H —17	Sup D ts; Sup F	H3—48	Sup E ts; Sup F
H —37	Sup D	H3—54	Sup E; Sup F ts
H —78	Sup D; Sup E	H3—56	Sup F ts
H2—16	Sup E	H3—61	Sup F ts
H2—36	Sup D ts; Sup E	H3—69	Sup D ts; Sup E; Sup F ts
H3—39	Sup F	H3—93	Sup F ts
H3—44	Sup E ts; Sup F	T4Д	—

ts — супрессируется при 37°, не супрессируется при 42°.

Во всех необходимых случаях добавлялся стрептомицин 200 мкг/мл.

Выделение мутантов. Ночная культура бактерий разбавлялась в 50 раз в среде МПБ и инкубировалась при 37° в течение трех час. при интенсивной аэрации. Бактериальная суспензия в титре $\sim 1 \times 10^9$ осаждалась центрифугированием в течение 20 мин при 3000 об/мин. Осадок промывался средой М9 и вторично центрифугировался. Затем осадок концентрировался ресуспендированием, в 50 раз меньшем объема среды М9. Суспензия (по 0,2 мл) высевалась на среде Эндо с 200 мкг/мл СМ. Выросшие колонии очищались на этой же среде с помощью серийных пересевов.

Проверка способности СМ-р мутантов супрессировать различные нонсенсные мутации бактериофага Т4В проводилась по Бензеру [6].

Результаты и обсуждение. Всего было выделено около 300 спонтанных СМ-р мутантов у штаммов *E. coli*, приведенных в табл. 1. Результаты выделения и частота встречаемости этих мутантов обобщены в табл. 3.

Как видно из таблицы, частота встречаемости СМ-р мутантов очень низка (10^{-10} — 10^{-9}).

В настоящем сообщении приводятся данные по анализу штамма CA180, несущего SupE амберный супрессор. Для обнаружения стрептомицинзависимых мутантов проверялась способность роста СМ-р культур штамма CA180 на полноценной среде без добавления антибиотика.

Таблица 3

Частота встречаемости СМ-р мутантов у различных супрессор
содержащих штаммов E coli K12

Использованные штаммы	Общее число проверенных клеток	Обнаружено СМ-р мутаций	Мутационный индекс
CA154	$6,7 \times 10^{10}$	30	$0,9 \times 10^{-10}$
CA165	$1,1 \times 10^{10}$	34	$0,6 \times 10^{-10}$
CA157	$2,8 \times 10^{10}$	58	$0,5 \times 10^{-10}$
CA266	$1,4 \times 10^{10}$	6	$0,1 \times 10^{-10}$
CA180	$2,1 \times 10^{10}$	128	$0,1 \times 10^{-10}$
CA265	$0,2 \times 10^{10}$	35	$0,5 \times 10^{-10}$
CA70	$0,8 \times 10^{10}$	44	$0,9 \times 10^{-10}$
FIY	$2,4 \times 10^{10}$	7	$0,2 \times 10^{-10}$

Результаты такой проверки, представленные в табл. 4, показывают, что из 72 независимо выделенных мутантов 8 растут только при добавлении СМ в среду, т. е. являются стрептомицинзависимыми. Следовательно, мутации этого типа встречаются реже (приблизительно в 10 раз), чем стрептомицинрезистентные.

Таблица 4

Рост СМ-р мутантов E. coli CA180 на полноценной среде при 37° без СМ

№ п/п	Наименование мутанта	Оценка роста*	№ п/п	Наименование мутанта	Оценка роста	№ п/п	Наименование мутанта	Оценка роста
1	2—180	3	25	45—180	0	49	79—180	3
2	5—180	3	26	48—180	3	50	80—180	3
3	9—180	3	27	49—180	3	51	81—180	3
4	10—180	3	28	50—180	3	52	84—180	0
5	11—180	3	29	51—180	3	53	85—180	3
6	16—180	3	30	53—180	3	54	86—180	3
7	18—180	3	31	54—180	3	55	89—180	3
8	19—180	0	32	56—180	3	56	90—180	0
9	20—180	0	33	57—180	3	57	91—180	3
10	21—180	3	34	58—180	3	58	93—180	3
11	28—180	3	35	59—180	3	59	94—180	3
12	29—180	0	36	60—180	3	60	96—180	3
13	30—180	3	37	61—180	3	61	97—180	3
14	31—180	3	38	63—180	3	62	100—180	3
15	33—180	3	39	65—180	3	63	107—180	3
16	34—180	3	40	66—180	3	64	114—180	3
17	35—180	3	41	68—180	3	65	117—180	3
18	36—180	3	42	70—180	3	66	119—180	3
19	37—180	3	43	72—180	3	67	120—180	3
20	38—180	3	44	73—180	3	68	121—180	3
21	39—180	3	45	74—180	3	69	122—180	3
22	40—180	3	46	76—180	3	70	124—180	3
23	42—180	0	47	77—180	3	71	126—180	3
24	44—180	3	48	78—180	3	72	127—180	3
							CA180 (исходная культура)	3

* Оценку роста мутанов проводили по четырехбальной системе:
а. при очень хорошем росте (наравне с исходной культурой) давали оценку—3.
б. при более слабом росте—2.
в. в случае очень плохого роста (следы) давали оценку—1.
г. отсутствие роста регистрировали как—0.

Было показано [6, 16], что СМ-рм мутация у штамма, ауксотрофного по аргинину, в некоторых случаях приводила к способности штамма расти без добавления аргинина в среду. Можно было предположить, что могла существовать и обратная картина действия СМ-р мутаций, т. е. стрептомицинрезистентность могла привести к возникновению у прототрофного штамма потребности в различных питательных факторах роста.

Это предположение проверялось определением способности роста выделенных мутантов на минимальной агаризованной среде М9. Результаты этой проверки приводятся в табл. 5, из которой видно, что ис-

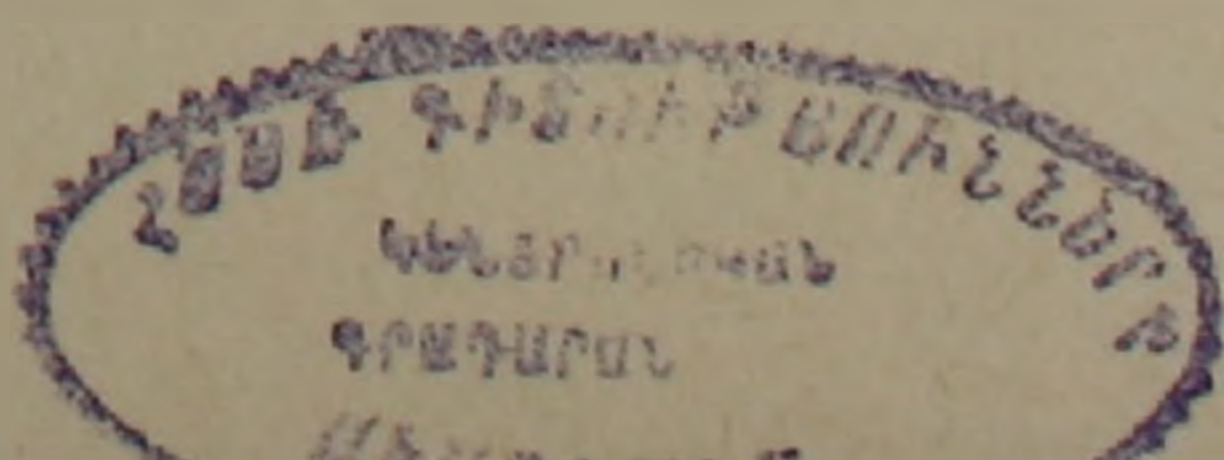
Таблица 5

Рост СМ-р и СМ-з мутантов *E. coli* CA180 на агаризованной среде М9 при 37° без СМ

№ п/п	Наименование мутанта	Оценка роста*	№ п/п	Наименование мутанта	Оценка роста	№ п/п	Наименование мутанта	Оценка роста
1	2—180	1	25	45—180	0	49	79—180	3
2	5—180	3	26	48—180	3	50	80—180	3
3	9—180	3	27	49—180	3	51	81—180	2
4	10—180	3	28	50—180	3	52	84—180	0
5	11—180	3	29	51—180	3	53	85—180	3
6	16—180	3	30	53—180	3	54	86—180	3
7	18—180	1	31	54—180	3	55	89—180	3
8	19—180	0	32	56—180	3	56	90—180	0
9	20—180	0	33	57—180	3	57	91—180	3
10	21—180	3	34	58—180	3	58	93—180	3
11	28—180	3	35	59—180	1	59	94—180	3
12	29—180	0	36	60—180	3	60	96—180	1
13	30—180	3	37	61—180	3	61	97—180	3
14	31—180	1	38	63—180	3	62	100—180	3
15	33—180	3	39	65—180	3	63	107—180	3
16	34—180	3	40	66—180	0	64	114—180	2
17	35—180	3	41	68—180	3	65	117—180	3
18	36—180	3	42	70—180	3	66	119—180	3
19	37—180	3	43	72—180	3	67	120—180	3
20	38—180	3	44	73—180	3	68	121—180	3
21	39—180	2	45	74—180	3	69	122—180	3
22	40—180	3	46	76—180	3	70	124—180	3
23	42—180	0	47	77—180	0	71	126—180	3
24	44—180	1	48	78—180	2	72	127—180	3
						CA180 (исходная культура)		3

* Обозначения соответствуют табл. 4.

ходный штамм CA180 не нуждается в добавлении различных питательных факторов роста и нормально растет на полноценной и минимальной средах. СМ-р мутанты этого штамма по своему поведению отличаются от исходной культуры. Мутанты, хорошо растущие на полноценной среде, например мутанты 1, 6, 13 (здесь и далее, для краткости мутанты будут называться порядковыми номерами табл. 4), вследствие СМ-р мутации утрачивают способность роста на минимальной среде. Надо отметить, что различные СМ-р мутанты претерпевают различные изменения. В некоторых случаях (мутанты 21, 48, 51, 64) стрептомицинрезистентность слабо действует на способность мутантов расти на среде М9, в других случаях (мутанты 1, 7, 14, 24, 35, 40, 60), приводит к от-



сутствию роста или к очень плохому росту. Отсутствие роста у СМ-з мутантов (мутанты 8, 9, 12, 23, 25, 47, 52, 56) естественно, так как в среду не добавлен стрептомицин. Проверка роста этих мутанов на среде М9 с 200 мкг/мл стрептомицина показала, что мутации к СМ-з также могут привести к различным изменениям роста клетки. Таким образом, можно считать, что мутации к СМ-р и СМ-з прототрофного штамма иногда приводят к более или менее выраженной ауксотрофности.

Поскольку исходный штамм СА 180 несет амберный супрессор, было интересно проверить, как отразится СМ-р мутация на поведении этого супрессора. Для этого определялась способность мутантов поддерживать рост амберных мутантов фага Т4В. Результаты приводятся в табл. 6. Как видно из приведенных данных, большинство мутантов поддерживают рост фага так же, как и исходный штамм СА180. Наряду с этими, среди выделенных мутантов обнаруживаются и такие, у которых утрачивается способность «узнавания» соответствующей амберной нонсенс мутации супрессором Sup E. Такие мутанты (I и II типы) обнаруживают Su—фенотип. У ряда мутантов наблюдается изменение специфичности супрессора Sup E в отношении отдельных нонсенс мутаций фага Т4В. По типу вызванных ими изменений картины супрессии СМ-р мутанты можно подразделить, по меньшей мере, на 5 классов (табл. 6).

Таблица 6

Возможные изменения супрессирующей способности амберного супрессора при наличии различных СМ-р мутаций при 37° без СМ

№ п/п	Амберные мутанты фага Т4В	Типы изменения Sup E амберной супрессии				
		I	II	III	IV	V
1	H—17	—	—	—	—	—
2	H—37	—	—	—	—	—
3	H—68	÷	—	+++	+++	+++
4	H2—16	—	—	++	++	++
5	H2—36	—	—	+++	+++	+++
6	H3—39	—	—	—	—	—
7	H3—44	—	—	÷	++	++
8	H3—48	—	—	—	—	—
9	H3—54	÷	—	+++	+++	+++
10	H3—56	—	—	—	÷	—
11	H3—61	—	—	—	—	—
12	H3—69	—	—	—	—	—
13	H3—93	—	—	—	—	—
14	T4B	+++	+++	+++	+++	+++

Обозначения:

«+++» — отмечается прозрачная литическая зона,

«++» — четкая литическая зона,

«+» — мутная литическая зона,

«÷» — нестабильные мутанты,

«—» — отсутствие зоны.

СМ-р мутанты возникают с низкой частотой (порядка 10^{-10} — 10^{-9}), а СМ-з мутанты в 10 раз реже. Причины столь низкой частоты встречаемости СМ-р и СМ-з мутаций пока остаются неизвестными. Однако на основании имеющихся данных можно предположить, что из многих возможных изменений стрептомицинового гена очень немногие приводят к возникновению резистентности или зависимости, тогда как большинство изменений либо ведет к гибели клетки, либо не приводит к регистрируемым изменениям ее свойств, и по этой причине они не отбираются при обычных методах селекции мутантов. По-видимому, с точки зрения сохранения функциональной активности «стрептомицинового» белка из многих возможных замен аминокислотных остатков в его молекуле приемлемы лишь замены некоторых аминокислот. В пользу такого предположения говорят данные, полученные в лаборатории Вигмана. Анализ аминокислотного состава S 12 белка стрептомицинчувствительных штаммов и трех типов СМ-р мутантов (полученных у этих штаммов) показал, что у одного мутанта вследствие СМ-р мутации произошла замена лизина аргинином в положении 87 у белка S 12, у другого мутанта лизин заменен аргинином (положение 42), а у третьего мутанта в том же положении лизин заменен аспарагином [9].

Мутации к СМ-р имеют плейотропное проявление, следствием которого является изменение ряда свойств бактериальной клетки [2]. С этой точки зрения представляют интерес данные питательных потребностей СМ-р и СМ-з мутантных клеток (табл. 5). Такой эффект СМ-р мутаций не является неожиданным. Возможно, в анализированных нами случаях мутация к СМ-р или СМ-з приводит к измененному включению определенных аминокислот в состав ферментов, ответственных за синтез тех или иных питательных потребностей клетки, в результате чего последние становятся биологически неактивными, что и приводит к ауксотрофности. Допущение, что ауксотрофность является результатом второй мутации, исключается экспериментами по переносу Str.A локуса из СМ-р мутантов в исходный СА 180 штамм с помощью трансдукции фагом P1кс. Анализ трансдуктантов показал, что все они становятся ауксотрофными.

Следует отметить, что ошибочное включение аминокислот в молекулы ферментов, повреждение которых может привести к ауксотрофности, не является единственным возможным исходом. Для объяснения изменений питательных потребностей СМ-р и СМ-з мутантов могут служить данные, полученные в лаборатории Полглейс, из которых (на примере ферментов, чувствительных к катаболической репрессии) можно заключить, что стрептомициновые мутации могут привести к дисбалансу этих ферментов за счет нарушения регуляторных механизмов клетки [8]. Не исключено, что наблюдаемые нами изменения являются результатом такого типа нарушений.

Нами обнаружено также, что мутации к СМ-р приводят к изменению характера супрессии нонсенс мутаций фага T4В (табл. 6). В большинстве случаев СМ-р мутации ограничивают эффективность различных

генетических супрессоров. Можно предположить, что определенные СМ-р мутации вызывают понижение эффективности изученного нами Sup E амберного супрессора в разной степени, чем и можно объяснить возможность обнаружения пяти различных типов мутантов по этому признаку. Рестрикция амберных супрессоров Sup D, Sup E, Sup F, а также охровых супрессоров (3, 10, 13, 14) дает основание считать, что обнаруженный феномен не является характерным только для Sup E супрессора. Из представленных данных можно заключить, что полученные СМ-р и СМ-з мутации у различных штаммов *E. coli* приводят к широкому спектру изменений свойств бактериальных клеток.

Чаренцаванский филиал Всесоюзного
научно-исследовательского института
генетики и селекции промышленных
микроорганизмов

Поступило 15.V 1974 г.

Մ. Գ. ՇՈՎԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ի. Ն. ԲԱՐԵԳԱՄՅԱՆ

ՍՏՐԵՊՏՈՄԻՑԻՆԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆԱԽՆԱԿԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ *ESCHERICHIA COLI* K 12 ՏԱՐԲԵՐ
ՇՏԱՄՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ու մ

E. coli-ի տարբեր շտամների մոտ ստացված են ստրեպտոմիցինակայուն (րեզիստենտ) և ստրեպտոմիցինից կախում ունեցող մուտանտներ: Տվյալները ցույց են տալիս այդ մուտանտների ստացման բնականից ցածր հաճախականությունը: Մուտանտները տարբերվում են լիարժեք և սինթետիկ միջավայրերի վրա աճելու, ինչպես նաև T4B ֆագի նոնսենս մուտացիաները սուպրեսելու ընդունակությամբ: Նրկու տիպի մուտացիաներն էլ ի հայտ են բերում պլեյոտրոպ արտահայտություն, որն, ըստ երևույթին, բջջի սպիտակուցների փոփոխության արդյունք է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги, М., 1961.
2. Кудлай Д. Г., Чубков В. Ф., Оганесян М. Г. Генетика лекарственной устойчивости бактерий, 1972.
3. Оганесян М. Г., Барегамян И. Н. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 18, 1970.
4. Apirion D., Philips S., Schlessinger D. Cold. Spr. Harb Symp. Quaaant. Biol., 34, 117, 1969.
5. Apirion D., Schlessinger D. J. Bacteriol., 94, 1125, 1967.
6. Benzer S. and Champe S. P. Proc. Natl. Acad. Sci. US, 47, 1025, 1961.
7. Breckenridje L., Gorini L. Genetics, 65, 1, 1970.
8. Gunkell M., Pollglase W. J. Biochem., 30, 279, 1969.
9. Funatsu G., Nierhaus K. and Wittmann H. Biochem. and biophys. acta, 287, 282, 1972.
10. Gartner T. K., Orias E. J. Bacteriol., 91, 1021, 1966.

11. *Gorini L.* Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 101, 1969.
12. *Leboy R., Cox E., Flaks J.* Proc. Natl. Acad. Sci. US, 52, 1367, 1964.
13. *Kuwano M., Ishizawa M., Endo H.* J. Mol. Biol., 33, 513, 1968.
14. *Reale-Scaffatti A.* Virology, 32, 543, 1967.
15. *Stoffler G., Wittmann H.* Proc. Natl. Acad. Sci. US, 68, 2283, 1971.
16. *Strigini P., Gorini L.* J. Mol. Biol., 47, 517, 1970.
17. *Taylor A. L., Trotter C. D.* Bacteriol. rev., 36, 504, 1972.
18. *Traub P., Nomura M.* Sciens, 160, 198, 1968.