

М. К. ВАРТАНЯН, Ж. А. КЦОЯН, Б. Б. КАРАБЕКОВ

ТРАНСДУКЦИЯ У SALMONELLA, ОСУЩЕСТВЛЯЕМАЯ ФАГАМИ dp 8, dp 9

Работа посвящена изучению трансдуцирующей способности новых фагов *S. derby*. Оказалось, что фаги dp 8 и dp 9 осуществляют генерализованную трансдукцию с довольно высокой частотой и могут быть с успехом использованы при разрешении различных генетических задач.

Трансдуцирующие фаги являются мощным инструментом в разрешении ряда важнейших задач молекулярной генетики, таких как составление генетических, делеционных карт, конструирование новых штаммов. Бактериофаги, способные осуществлять генерализованную трансдукцию у различных штаммов *Salmonella*, известны давно. Так, впервые явление трансдукции у микроорганизмов было обнаружено с помощью фага P 22 у *S. typhimurium* [1, 2].

Род *Salmonella* представлен большим числом микроорганизмов, имеющих различную антигенную структуру и играющих важную роль в инфекционной патологии человека и животных [3]. Понятно, что генетический анализ различных представителей этого обширного рода невозможно осуществить с помощью нескольких известных трансдуцирующих бактериофагов, поскольку спектр литической активности их ограничен, а эффективность трансдукции в ряде случаев может быть сведена на нет из-за явления рестрикции фагов, обусловленной клеткой хозяина.

В свете сказанного обнаружение новых трансдуцирующих фагов, лизирующих новые группы микроорганизмов из рода *Salmonella*, позволит значительно расширить возможности изучения различных волн генетики этих микроорганизмов.

Целью нашей работы было изучение трансдуцирующей способности бактериофагов, растущих на *S. derby* и ряде штаммов других серотипов *Salmonella*.

Материал и методика. Использованы фаги dp 8, dp 9, выделенные из природных лизогенных штаммов *S. derby* [4—6]. В качестве донорных штаммов применялись природный прототрофный штамм K 89 *S. derby* и штамм LT 2 *S. typhimurium*, в качестве реципиентных—ауксотрофные мутанты штамма K 89 (табл. 1) и полнауксотрофный штамм SL 4522 *S. abony*, нуждающийся в лейцине, гистидине, цистине и не сбраживающий мальтозу. В качестве полноценной среды, обеспечивающей рост как прототрофных, так и ауксотрофных штаммов, применяли мясоептонный бульон (МПБ) и агаризованные среды, приготовленные на его основе. Минимальной сре-

дой, обеспечивающей рост только прототрофных штаммов, служила среда следующего состава (г/л): NH_4Cl —20; NH_4NO_3 —4; Na_2SO_4 —8; KH_2PO_4 —4; K_2HPO_4 —12; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,4. Для обеспечения роста ауксотрофных мутантов к минимальной среде добавлялись соответствующие факторы потребности.

Таблица 1
Характеристика ауксотрофных мутантов штамма K 89 S. derby

Название мутанта	Ростовые потребности
K 90 S. derby	изолейцин—валин
K 91 S. derby	лейцин
K 92 S. derby	тирозин
K 93 S. derby	аргинин
K 94 S. derby	гистидин
K 95 S. derby	лизин
K 96 S. derby	триптофан
K 97 S. derby	метионин
K 98 S. derby	глицин
K 99 S. derby	аргинин—гистидин
K100 S. derby	аргинин—метионин
K101 S. derby	аргинин—триптофан
K102 S. derby	аргинин—треонин

Фаги др 1—8 одинаково чувствительны как к дикому штамму K 89 ($T=4-5 \cdot 10^{11}$), так и ко всем перечисленным ауксотрофным мутантам ($T=4-6 \cdot 10^{11}$).

Ауксотрофные мутанты штамма K 89—получены мутагенизацией с помощью обработки бактериальных клеток 20% раствором этилметансульфоната (ЭМС) в стадии логарифмического роста. Обработанные мутагеном бактериальные клетки дополнительно инкубировались в МПБ в течение 18 час. при $t37^\circ$. Ауксотрофные мутанты идентифицировались методом реплик по их неспособности расти на минимальной среде [7]. Специфические потребности выделенных ауксотрофных мутантов в определенном факторе роста определяли по методу Холлидея [8]. Дополнительная ауксотрофность по различным аминокислотам у *arg*-штамма K 93 получена с помощью мутагенной обработки ЭМС по вышесписанной методике и направленным отбором мутантов по маркерам—гистидин, лейцин, пролин, метионин, триптофан, треонин—на соответствующих селективных средах.

Трансдукция прототрофности. Фаголизаты бактериофагов др 8, др 9 получали по общепринятой методике [9] на донорных культурах. Реципиентом служили ауксотрофные мутанты соответствующих культур. Двухчасовую культуру реципиента заражали фагом при множественности инфекции 0,1, 1,0 и 10,0 и после инкубации в течение 15 мин центрифугировали при 6000 об/мин для осаждения бактерий с адсорбированным фагом. Осадок промывали дважды физиологическим раствором и затем высеивали на чашки с минимальным агаром. Результат трансдукции оценивали по числу выросших колоний-прототрофов. Одновременно ставили контроль на количество спонтанных реверсий к прототрофности, который учитывался в каждом конкретном случае. Частота трансдукции определялась отношением числа трансдуктантов, образовавшихся на селективных средах, к числу фаговых частиц, заразивших клетки реципиента.

Результаты и обсуждение. Для проведения опытов по трансдукции прототрофности с помощью фага др 8 у чувствительного к нему штамма K 89 были получены 114 мутантов, из которых 9 оказались ауксотрофами, нуждающимися в каком-либо одном факторе роста. С целью изучения частоты трансдукции по отдельным маркерам были получены также двойные ауксотрофы у *arg*-мутанта (табл. 1).

В первой серии опытов изучалась трансдуцирующая способность фага др 8. Донором служил дикий штамм K 89 *S. derby*, реципиентом— ауксотрофный мутант K 93 и двойной ауксотрофный мутант K 101. Результаты этих опытов обобщены в табл. 2.

Таблица 2

Трансдукция прототрофности ауксотрофным штаммам *S. derby* фагом др 8

Реципиентная культура							
K93 <i>arg</i> ⁻			K101 <i>arg</i> ⁻ <i>trp</i> ⁻				
множе- ствен- ность зара- жения	число вы- росших ко- лоний в 1 мл	частота трансдук- ции	множествен- ность зара- жения	число вы- росших ко- лоний в 1 мл		частота трансдукции	
	<i>arg</i>			<i>arg</i>	<i>trp</i>	<i>arg</i>	<i>trp</i>
10,0	0	0	10,0	0	0	0	0
1,0	380	$2 \cdot 10^{-6}$	1,0	200	0	$1 \cdot 10^{-6}$	0
0,1	231	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,1	240	14	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-7}$
Контроль	0			0	0		

Результаты опытов показали, что фаг др 8 осуществляет трансдукцию, величина которой наивысшая при множественности заражения, равной 0,1, а при 10,0 она не осуществляется. Трансдукция маркера *trp* осуществляется только при множественности заражения 0,1, причем частота трансдукции маркера *trp* на порядок меньше частоты трансдукции маркера *arg*.

Во второй серии опытов изучалась трансдуцирующая способность фага др 9, донором служил штамм LT2 *S. typhimurium*, а реципиентом— SL 4522 *S. abony*. Была исследована величина трансдукции отдельных маркеров *mal* и *his*. Данные приведены в табл. 3.

Таблица 3

Трансдукция прототрофности ауксотрофному штамму
SL 4522 *S. abony* фагом др 9

Множественность заражения	Число выросших колоний в 1 мл		Частота трансдукции	
	<i>his</i>	<i>mal</i>	<i>his</i>	<i>mal</i>
10,0	15000	4000	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
1,0	700	50	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$
0,1	440	2	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-8}$
Контроль	9	0		

Результаты опытов показали, что фаг др 9 осуществляет трансдукцию при всех исследованных множественностях инфекции с довольно высокой частотой.

Таблица 4

Трансдукция прототрофности аукоотрофному
штамму SL 4522 *S. abony* фагом P 22

Множественность заражения	Число выросших колоний в 1 мл		Частота трансдукции	
	his	mal	his	mal
10,0	3120	18200	$8 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$
1,0	50	100	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$
0,1	4	6	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
Контроль	80	0		

Параллельно с фагами dp 8 и dp 9 проверили эффективность трансдукции, осуществляемой известным трансдуцирующим фагом P 22, используя в качестве донора штамм K 89 *S. derby*, являющийся, как ранее было показано [4, 6], рестриктивным штаммом для фага P 22.

В серии опытов по трансдукции, осуществляемой фагом P 22, реципиентом служила культура SL 4522. Исследовалась величина трансдукции отдельных маркеров mal и his. Данные приведены в табл. 4.

Данные показывают, что фаг dp 9 осуществляет трансдукцию подобно известному трансдуцирующему фагу P 22. Что же касается фага dp 8, то осуществляемая им трансдукция несколько отличается по характеру—при множественности инфекции, равной 10,0, у фага dp 8 трансдукция отсутствует, в то время как у фагов dp 9 и P 22 наблюдается наивысшая частота трансдукции. Таким образом, результаты показывают, что исследованные нами фаги dp 8 и dp 9 являются трансдуцирующими и могут быть успешно использованы в опытах по трансдукции. Трансдукция (максимальная частота— 10^{-5} — 10^{-6}), осуществляемая фагами dp 8 и dp 9, подобна описанным для других трансдуцирующих фагов [10, 11].

Осуществление общей трансдукции фагами dp 8, 9 *S. derby*, несущими случайные различные области бактериальной хромосомы, может послужить основой картирования и конструирования штаммов.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 22.IV 1977 г.

Մ. Կ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ, Բ. Պ. ՎԱՐՄԵԿԻՈՎ

SALMONELLA-ի ՏՐԱՆՍԴՈՒԿՑԻԱՆ dp 8, dp 9 ՖԱԳԵՐՈՎ

Ներկա հոդվածը նվիրված է նոր՝ *S. derby* ֆագերի տրանսդուկցիոն հատկությունների ուսումնասիրությանը: Ընդհանրացված տրանսդուկցիայի ուսումնասիրության ժամանակ պարզվել է, որ dp 8 և dp 9 ֆագերը հանդիսանում են տրանսդուկցիոն տրանսդուկցիայի բավական բարձր հաճախականությամբ և հաջողությամբ կարող են օգտագործվել տարբեր գենետիկական հարցերի լուծման ժամանակ:



TRANSDUCTION IN SALMONELLA BY dp8 AND dp9 PHAGES

The present work is concerned with the transduceable abilities of new S. derby phages — dp8 and dp9. They turned out to be transduceable with a rather high degree of transduction and can successfully be used to solve various genetic questions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Zinder N. D., Lederberg J. J. *Bacteriol.*, 64, 679, 1952.
2. Morse M. L., Lederberg E. M. *Genetics*, 41, 142, 1956.
3. Арбузова В. А. Автореф. докт. дисс., Л., 1975.
4. Карабеков Б. П., Вартанян М. К. Мат-лы II научн. конфер. Ин-та экспер. биол. АН АрмССР, 22—24, Ереван, 1968.
5. Вартанян М. К., Карабеков Б. П. Вопросы молекулярно-клеточной биол. и иммунол., Ереван, 1970.
6. Матевосян Н. А., Карабеков Б. П., Вартанян М. К. Вопросы молекулярно-клеточной биол. и иммунол., Ереван, 1971.
7. Lederberg J., Lederberg E. M. J. *Bacteriol.*, 63, 399, 1952.
8. Holliday R. *Nature*, 178, 987, 1956.
9. Адамс М. Бактериофаги, М., 1961.
10. Okada M., Watanabe T. *Nature*, 218, 5137, 185—187, 1968.
11. Velton B., Thorne B. J. *Bacteriol.*, 102, 2, 573—579, 1970.