

ПОЗИТИВНЫЙ МЕТОД ОТБОРА МУТАНТОВ ПО  
 АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЕ И БЕЛКУ-РЕЦЕПТОРУ ЦИКЛИЧЕСКОГО  
 3', 5'-АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА У *ESHERICHIA COLI* K 12

Ш. М. КОЧАРЯН

Показано, что мутации по аденилатциклазе (суа) и белку-рецептору циклического 3', 5'-аденозинмонофосфата (сгр) сообщают клеткам *E. coli* устойчивость к низким концентрациям рифампицина.

Разработан позитивный метод отбора мутантов суа и сгр, основанный на использовании рифампицина в качестве селективного агента. Мутанты, отобранные этим методом, не отличаются по изученным свойствам от описанных в литературе мутантов суа и сгр.

Циклический 3', 5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) в комплексе с белком-рецептором цАМФ активирует у некоторых видов бактерий транскрипцию катаболитчувствительных оперонов [4, 17]. Мутации суа и сгр, затрагивающие соответственно аденилатциклазу и белок-рецептор цАМФ, нарушают у *E. coli* синтез катаболитчувствительных ферментов. Ген суа локализуется на 84-й мин генетической карты *E. coli* K-12, около маркера *ilv* [8, 20], а ген сгр—на 73-й мин по соседству с геном *gpsL* [11]. Мутации суа и сгр имеют плеiotропное проявление: соответствующие мутанты не способны усваивать широкий круг органических соединений в качестве источников углерода и энергии [10, 16, 17], лишены жгутиков [20], дефектны по способности адсорбировать фаги  $\lambda$  и T6 [13, 14], обладают повышенной или пониженной устойчивостью к действию ряда химических и физических агентов, в том числе антибиотиков—стрептомицина, амнициллина [7, 14].

В настоящей работе нами показано, что мутанты суа и сгр более устойчивы к рифампицину, чем бактерии дикого типа. Предложен простой селективный метод отбора мутантов суа и сгр на индикаторных средах, содержащих низкие концентрации этого антибиотика.

*Материал и методика.* Генетическая характеристика и происхождение бактериальных штаммов, использованных в работе, даны в табл. 1. Фаг  $\lambda$ c1857b221 получен от Н. К. Янковского (ВНИИгенетика, Москва).

В качестве полноценной среды использовали бульон Лурия, минимальной—среду Адамса. Состав этих сред, а также концентрации вносимых добавок описаны ранее [2]. В качестве индикаторной среды, определяющей способность бактерий сбраживать сахара, использовали среду ЕМВ [5].

Штаммы *E. coli* K 12, использованные в работе

Наименование	Тип скрещиваемости и генотип*	Литературная ссылка
CA8306	HfrH, <i>суа</i> 854, <i>thi</i>	[9]
WZ25	F <sup>-</sup> , <i>rpsL</i> , <i>crp868</i> , <i>metB</i> , <i>rel</i>	[19]
SK110	HfrH, <i>lac</i> , <i>apt110</i> , <i>thi</i> , <i>purD</i> , <i>pup8</i>	[3]
SK383	HfrH, <i>lac</i> , <i>apt110</i> , <i>rpsL</i> , <i>crp868</i> , <i>thi</i> , <i>purD</i> , <i>pup8</i>	[1]
SK385	HfrH, <i>purE</i> , <i>rpsL</i> , <i>ilv</i> , <i>pup8</i>	[1]
SK386	HfrH, <i>purE</i> , <i>rpsL</i> , <i>суа854</i> , <i>pup8</i>	[1]
HfrK10	HfrK10, <i>ilv</i>	[1]
P678	F <sup>-</sup> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>lac</i> , <i>gal</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	[2]

\*—обозначение гена *apt* дано нами [3], остальных маркеров—соответствует номенклатуре, принятой Бачмэн с соавт. [8].

Стандартная методика трансдукции фагом P1кс описана ранее [2]. При использовании признака устойчивости к стрептомицину (*RpsL*<sup>-</sup>) в качестве селективного маркера трансдукционную смесь перед высевом на селективные среды инкубировали с целью огомозиготирования в бульоне Лурия в течение 4-х часов [1].

Для оценки устойчивости бактерий к фагу  $\lambda$  10<sup>9</sup> частиц фага растирали по поверхности полноценной агаризованной среды, затем с помощью репликаторной «щетки» наносили на агар капли суспензий исследуемых штаммов и через 18 час. инкубации при 42° сравнивали рост исследуемых и контрольных (устойчивых и чувствительных к фагу) штаммов.

Подвижность бактерий определяли по миграции зоны роста бактерий от места нанесения суспензии на поверхность полноценной среды, содержащей 0,7% агара.

*Результаты и обсуждение.* При работе с мутантами *суа* и *сгр* (штаммы CA8306 и WZ25, табл. 1) мы обнаружили, что в отличие от штаммов дикого типа они способны расти на средах, содержащих низкие концентрации (5—12 мкг/мл) рифампицина. Причиной такой устойчивости могло быть наличие в геноме этих штаммов мутации по гену *groB*, кодирующему синтез  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы, поскольку все изученные мутации устойчивости к рифампицину затрагивают этот ген [4, 12, 15]. Однако из данных табл. 2 следует, что среди трансдуктантов *rigD*<sup>+</sup>, отобранных в скрещиваниях с использованием в качестве доноров штаммов CA8306 и WZ25, не обнаруживаются формы, устойчивые к рифампицину.

Эти данные опровергают предположение, согласно которому устойчивость к рифампицину у штаммов CA8306 и WZ25 есть следствие мутации в гене *groB*, поскольку гены *rigD* и *groB* локализируются на 89-й мин генетической карты и наследуются совместно при трансдукции [8].

В то же время устойчивыми к рифампицину являлись все те трансдуктанты, которые наследовали мутации *суа* и *сгр* (табл. 2). Такую же устойчивость к рифампицину мы обнаружили у сконструированных нами ранее штаммов SK383 и SK386, дефектных по аденилатциклазе и белку-рецептору цАМФ, хотя соответствующие родительские штаммы,

Наследование признаков устойчивости к низким концентрациям рифампицина и неспособности усваивать различные источники углерода и энергии трансдуктантами PurD<sup>+</sup>, Hiv<sup>+</sup> и RpsL<sup>-</sup>

Донор	Реципиент	Селектируемый маркер*	Проверено трансдуктантов	Устойчивы к рифампицину	Не способны усваивать арабинозу, мальтозу и глицерин**
CA8306 (суа)	SK 110	PurD <sup>+</sup>	84	0	0
	SK 385	Hiv <sup>+</sup>	73	39	39
WZ25 (сгр)	SK 110	PurD <sup>+</sup>	52	0	0
	SK 110	RpsL <sup>-</sup>	96	52	52

\*—отбор трансдуктантов PurD<sup>+</sup> проводили на минимальной среде без пуринов, Hiv<sup>+</sup> — без изолоейцина и валина, RpsL<sup>-</sup> — на средах, содержащих 200 ед/мл стрептомицина [1].

\*\*—способность бактерий к усвоению арабинозы, мальтозы и глицерина оценивали по росту на средах, содержащих эти соединения в качестве единственных источников углерода и энергии, а также по интенсивности окраски колоний на средах ЕВМ [1].

SK110 и SK385, были чувствительны к этому антибиотику (табл. 1). Эти данные указывают на то, что устойчивость бактерий к низким концентрациям рифампицина есть следствие самих мутаций суа и сгр.

Мы задались целью использовать свойство устойчивости к рифампицину мутантов суа и сгр для разработки селективного метода отбора таких мутантов.

Независимые ночные культуры штаммов суа<sup>+</sup>, сгр<sup>+</sup> высевали на полноценную агаризованную среду, содержащую 3 мкг/мл рифампицина. Колонии, выросшие на этой среде через 72 час. инкубации при 37°, ресуспендировали в буфере и высевали на полноценную среду без рифампицина для получения чистых клонов, сохраняющих устойчивость к антибиотику. Всего нами было проверено около 45-ти мутантов независимого происхождения.

Устойчивость к рифампицину у всех этих мутантов, по-видимому, была вызвана мутацией в гене groV: они были устойчивы, как правило, к концентрациям, выше 20 мкг/мл и не обладали характерным свойством мутантов суа и сгр — неспособностью использовать арабинозу, мальтозу и глицерин в качестве источников углерода и энергии.

Таким образом, если среди мутантов, устойчивых к низким концентрациям рифампицина, имеются суа и сгр, то они возникают с более низкой частотой, чем мутанты groV, и необходима процедура, облегчающая их отбор среди последних.

Мы воспользовались тем обстоятельством, что мутанты суа и сгр на индикаторной среде ЕВМ с сахарами, которые они не способны сбраживать, образуют светло-розовые колонии, а штаммы дикого типа — темные. Отбор мутантов у штамма Hfg K10 проводили на среде ЕВМ,



содержащей арабинозу и мальтозу (по 0,5%) и рифампицин (8 мкг/мл). Приблизительно 1—2% появляющихся на такой среде колоний имело светлую окраску. Выход мутантов стимулировался, если перед инкубацией в центре агара устанавливался кристаллик нитрозогуанидина. После очистки на полноценной среде светло-розовых колоний было получено 5 клонов независимого происхождения, не способных к росту на средах с арабинозой, мальтозой и лактозой как единственными источниками углерода и энергии.

Таблица 3

Свойства мутантов, отобранных на индикаторных средах с рифампицином, в сравнении со свойствами родительского штамма HfrK10 и штаммов CA8306 (суа), WZ25 (сгр)

Штамм	Устойчивость к фагу*	Подвижность**	Размер колоний***	Способность к усвоению арабинозы, мальтозы и лактозы****	
				без цАМФ	с цАМФ
CA8306	R	—	м	—	+
WZ25	R	—	м	—	—
HfrK10	S	+	к	+	+
Мутанты					
№№ 1 и 2	R	—	м	—	+
№№ 3, 4 и 5	R	—	м	—	—

\*—R —устойчивость к фагу, S—чувствительность.

\*\*—«+»—способность к миграции, «—»—отсутствие этой способности.

\*\*\*—м—мелкие колонии, к—крупные колонии.

\*\*\*\*—см. примечание \*\* к табл. 2. Среда с цАМФ содержали 0,1 мл 0,05 М раствора цАМФ, растертого по поверхности агара чашки Петри.

Все 5 мутантов были устойчивы к фагу  $\lambda$  и не способны мигрировать на среде с 0,7% агара (табл. 3). Мутанты, в отличие от родительского штамма Hfr K10, образовывали на полноценной среде мелкие колонии, характерные для штаммов CA8306 и WZ25. Экзогенный цАМФ восстанавливал способность 2-х из 5-ти мутантов усваивать арабинозу, мальтозу и лактозу.

Таким образом, данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что 2 из отобранных нами 5-ти мутантов являются мутантами суа, а остальные—сгр.

С таким предположением согласуются результаты трансдукционного анализа мутантов (табл. 4). Из этих данных следует, что у мутантов, у которых цАМФ восстанавливает способность к сбраживанию сахаров, соответствующий дефект сцеплен при трансдукции фагом P1 с маркером *ilv*, т. е. расположен на генетической карте *E. coli* K-12 [8] на том же участке, где картированы описанные в литературе мутации суа [9, 14, 20]. Мутации, которые нарушают способность бактерий сбраживать сахара независимо от присутствия в среде цАМФ, оказались, как и описанные ранее [11, 18] мутации сгр, сцепленными с маркером *grsL*. Таким образом, отобранные описанным выше способом

Фенотип мутантов при введении трансдукцией аллелей *суа*<sup>+</sup> и *сгр*<sup>+</sup>

Реципиент* (№ мутанта)	Селектируемый маркер**	Проверено трансдуктантов	Из них восстановили		
			способность к усвоению сахаров	чувствительность к рифампицину	крупный размер колоний
1	<i>ilv</i> <sup>-</sup>	47	29	29	29
3	<i>RpsL</i> <sup>-</sup>	116	63	63	63
4	<i>RpsL</i> <sup>-</sup>	74	45	45	45

\*\*—см. примечание \* к табл. 2.

\*—донором во всех скрещиваниях служил штамм Р678 (*rpsL*, *ilv*<sup>-</sup>, *суа*<sup>-</sup>, *сгр*<sup>+</sup>).

мутации устойчивости к рифампицину оказались как по своему фенотипическому проявлению (неспособность сбрасывать сахара, мелкий размер колоний, устойчивость к фагу  $\lambda$  и отсутствие подвижности, табл. 3), так и по данным генетического картирования (табл. 4) идентичными описанным в литературе [7, 9, 10, 13, 14, 16, 18—20] мутациям *суа* и *сгр*.

Известно, что ингибирующее действие рифампицина на рост бактерий обусловлено его способностью связываться с  $\beta$ -субъединицей РНК-полимеразы и блокировать стадию инициации транскрипции [4]. Устойчивость бактерий к этому антибиотику являлась во всех изученных к настоящему времени случаях следствием изменения конформации РНК-полимеразы в результате мутации по структурному гену  $\beta$ -субъединицы—*groB* [4, 12, 15].

Представленные в настоящей работе данные показывают, что устойчивость к низким концентрациям рифампицина у бактерий может быть обусловлена также дефектом по аденилатциклазе или белку-рецептору цАМФ. Недавно было показано, что мутанты *суа* и *сгр* *Salmonella typhimurium* устойчивы к целому ряду антибиотиков; выдвинуто предположение, что такая устойчивость связана с нарушением транспорта антибиотиков в бактериальную клетку в результате мутаций *суа* и *сгр* [6]. Наиболее вероятно, что устойчивость мутантов *суа* и *сгр* *E. coli* к рифампицину также является следствием дефекта по транспорту.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 5.II 1979 г.

ESCHERICHIA COLI K-12-ի ԱԳԵՆԻԼՅԻՎԱԶԱՅԻ ԵՎ ՑԻՎԱՎՈՐ  
3',5'-ԱԳԵՆՈՋԻՆՄՈՆՈՖՈՍՖԱՏԻ ԲԵՅԵՊՏՈՐ ՍՊԵՏԱԿՈՒՅԻ  
ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ԸՆՏՐՈՒԹՅԱՆ ՊՈՋԻՏԻՎ ՄԵԹՈԴԸ

Շ. Մ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ *E. coli* մանրէի *суа* և *сгр* մուտանտները դիմացկուն են ըրիֆամպիցինի ցածր կոնցենտրացիաների ազ-

դեցույթյան հանդեպ: Հիմնվելով *cya* և *crp* մուտանտների այդ հատկության վրա, մշակված է նրանց ստացման նոր, մատչելի մեթոդ:

Ապացուցվում է, որ այդ մեթոդով ստացված *cya* և *crp* մուտանտներն իրենց հատկություններով չեն տարբերվում ավելի վաղ հայտնաբերված նման տիպի մուտանտներից:

## A POSITIVE METHOD FOR SELECTION OF ADENYL CYCLASE AND CYCLIC ADENOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE RECEPTOR PROTEIN DEFICIENT MUTANTS OF ESCHERICHIA COLI K-12

Sh. M. KOCHARIAN

The resistance of *cya* and *crp* mutants of *Escherichia coli* to rifampicin (5—12  $\mu\text{g/ml}$ ) has been shown. A positive method of *cya* and *crp* mutants selection based on the use of rifampicin as a selectional agent has been worked out. Mutants selected by this method are not distinguished by studied properties from known ones.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кочарян Ш. М. Генетика, 12, 10, 108, 1976.
2. Кочарян Ш. М., Лившиц В. А., Суходолец В. В. Генетика, 11, 11, 79, 1975.
3. Кочарян Ш. М., Чуканова Т. И., Суходолец В. В. Генетика, 13, 10, 1821, 1977.
4. Никифоров В. Г., Зограф Ю. Н. Молекулярная биология. 13 (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР). М., 1977.
5. Сб. методик по генетике микроорганизмов. Под редакцией Р. Клауса, У. Хейса, М., 1970.
6. Alper M. D., Ames B. N. J. Bacteriol., 133, 149, 1978.
7. Artman M., Werthamer S. J. Bacteriol., 120, 542, 1974.
8. Bachmann B. J., Low B. K., Taylor A. L. Bacteriol. Rev., 40, 116, 1976.
9. Brickman E., Soll L., Beckwith J. J. Bacteriol., 116, 582, 1973.
10. Emmer M., De Grombrughe B., Pastan J., Perlman R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 480, 1970.
11. Epstein W., Kim B. S. J. Bacteriol., 608, 639, 1971.
12. Iwakura J., Ishiama A., Yura T. Mol. Gen. Genet., 121, 181, 1973.
13. Jokota T., Kasuga T. J. Bacteriol., 109, 1304, 1972.
14. Kunar S. J. Bacteriol., 125, 545, 1976.
15. Mindlin S. Z., Ilyina T. S., Voeykova T. A., Velkov V. V. Mol. Gen. Genet., 115, 115, 1972.
16. Perlman R., Pastan J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 151, 1969.
17. Rickenberg H. V. Ann. Rev. Microbiol., 28, 353, 1974.
18. Sabourin D., Beckwith J. J. Bacteriol., 122, 338, 1975.
19. Silverstone A. E., Goman M., Scaife J. G. Mol. Gen. Genet., 118, 223, 1972.
20. Yokota T., Gots J. S. J. Bacteriol., 103, 513, 1970.