

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.24:576.851.48

МУТАНТЫ *ESCHERICHIA COLI* K-12, ДЕФЕКТНЫЕ ПО СПОСОБНОСТИ К УСВОЕНИЮ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

Ш. М. КОЧАРЯН, М. А. МЕЛКУМЯН

Начальный этап катаболизма пуриновых нуклеозидов клетками *E. coli* связан с фосфоролитическим расщеплением N-глюкозидной связи молекулы нуклеозида и образованием свободных оснований и пентозо-1-фосфата (рибозо- или дезоксирибозо-1-фосфата) в реакции, катализируемой пуриннуклеозидфосфорилазой (ген *pur*). Мутанты *pur* теряют способность усваивать пуриновые нуклеозиды в качестве единственных источников углерода и энергии для роста [5—7]. Кроме того, усвоение пуриновых, а также пиримидиновых нуклеозидов нарушает мутации по генам *dgp* и *dga*, ответственным за катаболизм пентозо-1-фосфата [5—7]. Вторая активность, также способная расщеплять пуриновые нуклеозиды, у штаммов *E. coli* дикого типа отсутствует, однако может быть индуцирована в результате мутаций, обозначенных *pnf* [2].

Целью настоящей работы было получение мутаций, которые нарушают у штаммов генотипа *pur pnf* усвоение пуриновых нуклеозидов, но не затрагивают известные гены катаболизма нуклеозидов.

Материал и методика. Состав сред, условия культивирования бактерий, методики конъюгационных и трансдукционных (фаг P1) скрещиваний и определения гуанозиндеградирующей активности в бесклеточных экстрактах бактерий описаны ранее [1, 2]. В качестве исходного штамма для выделения мутантов использовали штамм *E. coli* K-12 SK 401 (генотип *HfrH, purD, pur 8, pnf 1*), который благодаря наличию в геноме мутации *pnf 1* способен расщеплять все пуриновые нуклеозиды, несмотря на дефект по гену *pur* [2]. Культуру штамма SK 401 обрабатывали нитрозогуанидином [4], высевали на минимальную глюкозосолевою среду с гипоксантином как источником пуринов, а затем методом отпечатков выявляли среди выросших колоний мутанты, не способные к усвоению пуриновых нуклеозидов в качестве источников углерода и энергии или источников пуринов.

Результаты и обсуждение. Два из отобранных нами мутантов (представитель обозначен МК 466) штамма SK 401 были не способны к усвоению ксантозина, гуанозина, дезоксигуанозина, а также ксантина и гуанина в качестве источников пуринов, но сохранили способность к

усвоению нуклеозидов ксантина и гуанина в качестве источников углерода и энергии. Такой фенотип мог быть обусловлен мутацией в одном из двух генов—*gpt* (фермент гуанинфосфорибозилтрансфераза) или *guaC* (гуанозинмонофосфатредуктаза) [3]. Ген *gpt* располагается на генетической карте *E. coli* рядом с геном *proA*, а *guaC*—с геном *leu* [3]. Из данных табл. 1 следует, что мутация, нарушающая способность бактерий к усвоению производных гуанина и ксантина в качестве единственных источников пуринов, наследуется в конъюгационных скрещиваниях с большей частотой с маркером *leu* чем *proA*, а при трансдукции—только с маркером *leu*. Следовательно, мутация в штамме МК 466 затрагивает уже известный локус *guaC*.

Таблица 1
Наследование мутации, нарушающей усвоение производных ксантина и гуанина в качестве единственных источников пуринов, рекомбинантами от скрещиваний мутанта МК 466 с реципиентами SK 12*

Тип скрещивания	Селектируемые рекомбинанты	Проверено рекомбинантов	Не усваивают производные ксантина и гуанина	Частота наследования с селектируемым маркером, %
Конъюгация	<i>Leu</i> ⁺ <i>RpsL</i> ⁻	71	71	100
	<i>ProA</i> ⁺ <i>RpsL</i> ⁻	27	9	33
Трансдукция	<i>Leu</i> ⁺	95	27	28
	<i>ProA</i> ⁺	96	0	< 1

*—Генотип SK 12-F⁻, *pur* 8, *leu*, *proA*, *rpsL*, *purD* [1].

Таблица 2
Способность штаммов SK 110, SK 401 и МК 462 к росту на средах с нуклеозидами как источниками углерода и энергии и дезоксигуанозиндеградирующая активность в бесклеточных экстрактах, ммМ превращенного субстрата за мин/мг белка

Штамм*	Генотип	Способность к росту на среде с			Гуанозиндеградирующая активность
		пуриновыми нуклеозидами**	уридином	тимидином	
SK 110	<i>pur</i>	—	+	+	< 10
SK 401	<i>pur</i> , <i>pnd</i> 1	+	+	+	158
МК 462	<i>pur</i> , <i>pnd</i> , <i>supnd</i>	—	+	+	< 10
SK 111	дикий тип	+	+	+	91

*—Штамм SK 110 родительский по отношению к SK 401 [2].

**—Проверены аденозин, инозин, гуанозин, дезоксигуанозин, дезоксиинозин и дезоксиаденозин.

В числе прочих было отобрано также два мутанта (представитель МК 462), которые были не способны к усвоению всех пуриновых нуклеозидов как источников углерода и энергии (соответствующий дефект пред-

варительно обозначали как *supnd*, (табл. 2). Мутант МК 462 сохранил способность к усвоению в качестве источников углерода и энергии пиримидиновых нуклеозидов—уридина и тимидина, что свидетельствует о том, что полученная мутация не затрагивает гены *dgM* и *dga*, ответственные за катаболизм пентозо-1-фосфата. В конъюгационных скрещиваниях с множественно-маркированными штаммами F⁻ было обнаружено, что при использовании в качестве донора штамма МК 462 мутация *rnd* наследуется в потомстве рекомбинантов His⁺RpsL⁻, Trp⁺RpsL⁻ и Gal⁺RpsL⁻ с теми же частотами, что и при использовании в качестве донора штамма SK 401. Данные табл. 2 показывают, что мутация в штамме МК 462 не затрагивает локус *rnd*. Бесклеточные экстракты штамма МК 462 в отличие от экстрактов родительского штамма SK 401 не способны расщеплять дезоксигуанозин. Следовательно, фенотип штамма МК 462 не обусловлен дефектом по транспорту пуриновых нуклеозидов. В предположении, что ген *rnd* является структурным геном фермента, который в результате мутирования приобретает способность к фосфоролизу пуриновых нуклеозидов, мутация *supnd* является, по видимому, мутацией по гену—регулятору, контролирующему активность структурного гена *rnd*.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 16.II 1979 г.

**ՊՈՒՐԻՆԱՅԻՆ ՆՈՒԿԼԵՈԶԻԴՆԵՐԻ ՅՈՒՐԱՑՄԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆՅ
ԹԵՐԻ ESCHERICHIA COLI K-12-Ի ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԸ**

Շ. Մ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ՄԵԼՔԵՒՄՅԱՆ

E. coli K-12-ի շտամները *rnd* մուտացիայի շնորհիվ ի վիճակի են քայքայել պուրինային նուկլեոզիդները և յուրացնել նրանց իբրև ածխածնի և էներգիայի աղբյուր: Այդպիսի շտամից ստացված է մուտանտ, որը անընդունակ է յուրացնել պուրինային բոլոր նուկլեոզիդները:

Հայտնաբերված է, որ մուտանտի նուկլեոզիդների քայքայմանը պատասխանատու գեները վնասված չեն, սակայն *in vitro* փորձերում մուտանտը թերի է պուրինային նուկլեոզիդները քայքայող ակտիվությունից: Այսպիսով, ստացված է մուտացիա, որը կանխում է *rnd* գենի արտահայտությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Кочарян Ш. М., Лившиц В. А., Суходолец В. В. Генетика, 11, 11, 79, 1975.
2. Кочарян Ш. М., Смирнов Ю. В. Генетика, 13, 8, 1405, 1977.
3. Лившиц В. А. Генетика, 9, 1, 134, 1973.
4. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
5. O'Donovan G. A., Neuhaud J. Bacteriol. Rev., 34, 278, 1970.
6. Gots J. S. Metabolie pathways, 5, 225, 1971.
7. Gots J. S., Benson C. E. Ann. Rev. Genet., 8, 79, 1974.