Установлено, что потребность в лейцине приводит к снижению валинпродуцирующей активности исходной культуры до следовых количеств. Потребность в изолейцине у двух мутантов (И-112, И-127) приводит почти к двукратному увеличению биосинтеза валина. Естественно, потребность в валине и валин+лейцин+изолейцине приводит к полному блокированию биосинтеза валина.

Из приведенных результатов следует, что мутации по генам, контролирующим биосинтез аминокислот, с разветвленной цепью (валин, лейцин, изолейцин), по-разному влияют на процесс биосинтеза валина и что мутации, обусловливающие потребность в изолейцине, могут быть использованы для селекции активных продуцентов валина у штамма *S. marcescens*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арманджян А. О., Оганесян М. Г.* Биолог. ж. Армении, 37, 4, 339—342, 1984.
2. *Арманджян А. О., Оганесян М. Г.* Биолог. ж. Армении, 37, 6, 476—480, 1984.
3. *Арманджян А. О., Оганесян М. Г.* Биолог. ж. Армении, 37, 9, 735—740, 1984.
4. *Кара-Мурза С. Н., Тимохина Е. А., Жданова Н. Н.* Прикладная биохимия и микробиология, 17, 6, 813—819, 1981.
5. *Хейс Н. М., Мацек К.* Хроматография на бумаге. М., 1962.
6. *Crotlari P., Emaldi O., Materrz D.* Eur. J. Appl. Microbiol., 4, 3, 177—179, 1977.
7. *Davis B. D., Mignoli E. S.* J. Bacteriol., *60*, 17—28, 1950.
8. *Holliday R.* Nature, Lond., 3, 987, 1956.
9. *Lederberg J., Lederberg E.* J. Bacteriol, *62*, 3, 393, 406, 1952 .
10. *O. Nakayma K., Kitudu S., Kinoshita S.* J. General, and Appl. Microbiol., Tokyo, 7, 52, 1961.
11. *Kisumi M., Komatsubara S., Chibata I.* J. Bacteriol., *106*, 493—499, 1971.
12. *Kisumi M., Kato F., Komatsubara S., Chibata I.* Genetics of industrial microorganisms, 1, Bacteria, Amsterdam, 267—267, 1973.

Поступило 2.IX 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 864—869, 1986 УДК 577.5:579.253

СУПРЕССИЯ СВЕРХСИНТЕЗА КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ФАГОУСТОЙЧИВЫМИ МУТАЦИЯМИ У *LON*⁻ ШТАММОВ *E. COLI* K—12

Гар. Г. ОГАНЕСЯН, А. А. БАРСЕГЯН, Г. Г. ОГАНЕСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Аннотация — С помощью бактериофага М59, лизирующего капсулированные клетки, получены неслизистые мутанты у lon⁻ штамма *E. coli* K-12 с частотой 10^{-2}. Показано, что неслизистый фенотип мутантов связан с возникновением внегенных супрессорных мутаций, транслоцирующихся с гистидиновым геном с частотой 30—40%, и локализованных на 45-й мин генетической карты.

Անոտացիա — [illegible] *E. coli* K—12 [illegible] lon⁻ [illegible]

ձակեր ֆենոտիպը կապված է արտագեն սուպրեսորային մուտացիաների առաջացման հետ, որոնք տեղակայվում են գենետիկական քարտեզի 45-րդ և տրանսդուկցվում են հիստիդինային գենի հետ 30—40% հաճախականությամբ։

Abstract — By the bacteriophage M59, which lisated capsulated cells of *E. coli K—12*, we succeeded in obtaining non-slimed mutants with 10^{-2} frequency in *lon*$^-$ strains. It was shown that non-slimed phenotype of the mutants appeared to be caused by extragene suppressing mutations, located on the 45th minute of the genetic map, transduced with histidine gene with frequency of 30—40 per cent.

Ключевые слова: полисахариды E. coli K-12, бактериофаг M59, lon$^-$ мутации.

Клетки lon$^-$ мутантов *E. coli* К-12 образуют капсулу, состоящую из гетерополисахарида, названного колановой кислотой [6]. Биосинтез колановой кислоты находится под контролем множества генов, которые в свою очередь регулируются lon геном. У lon$^-$ мутантов отмечается 2—10-кратное увеличение активности генов, детерминирующих биосинтез мономеров колановой кислоты, в то время как уровень биосинтеза самого полисахарида повышается более чем в 100 раз [9—13, 17]. Такое несоответствие свидетельствует о более сложной регуляции его биосинтеза, где lon ген занимает, по-видимому, ключевую позицию. Известно, что генопродуктом lon гена является АТФ-зависимая протеаза, осуществляющая деградацию дефектных белков [3, 4, 14]. Участие этой протеазы в регуляции биосинтеза колановой кислоты остается невыясненным. Должны, по-видимому, существовать белки-регуляторы биосинтеза полисахаридов, которые атакуются этой протеазой. Обнаружить такие белки можно с помощью супрессорных мутаций, подавляющих сверхсинтез полисахаридов. Для обнаружения таких мутаций мы использовали вирулентный бактериофаг M59 [16], который специфически связывается с колановой кислотой и вызывает лизис капсулированных бактерий.

Материал и методика. Бактериальные штаммы и бактериофаги. В работе использовались *E. coli* К—12 CA 154 (Hfr—H, lac Z^-, thi$^-$). Мук 154—2, полученный как lon мутант штамм CA 154, J 62 (F^-, pro$^-$, trp$^-$, his$^-$), J 621 (F^- thi$^-$ lon$^-$ pro$^-$ trp$^-$ his$^-$) полученный от скрещивания штаммов Мук 154-2 и J62. Бактериофаг M59 получен от Стирма [16], P1 vir—от А. Г. Скавронской (Москва).

Питательные среды: Т-бульон—пептон—10 г, дрожжевой экстракт—5 г, NaCl—5 г на 1 литр дистиллированной воды; Т-агар—к Т-бульону добавлялся 0,6- или 1,2%-ный агар Дифко. Минимальная среда M9—по Адамсу [1]. Фосфатный буфер с pH 6,8. При необходимости L-аминокислоты добавлялись в концентрациях 20 мкг/мл, DL-аминокислоты—40 мкг/мл, тиамин—1 мкг/мл.

Выделение фагоустойчивых немукоидных мутантов. Суточная культура исходного штамма разводилась в соотношении 1:50 в свежем Т-бульоне и инкубировалась при интенсивной аэрации до достижения титра 10^8 клеток в 1 мл, затем делались серийные разведения в фосфатном буфере. На чашки с минимальной агаризованной средой наносилось 0,1 мл суспензии фага M59 титром около 10^7 и равномерно распределялась шпателем. Затем наносилась бактериальная суспензия (0,1 мл) и также распределялась по поверхности агара. Чашки ставились на инкубацию при 37° (2—3 дня). Образовавшиеся немукоидные колонии стерильной иглой переносились в буферную среду, встряхивались с целью освобождения от сопутствующих фаговых частиц и высевались на чашки штрихами. Колонии, сохранившие немукоидную морфологию, отбирались для дальнейшего изучения.

Изучение УФ-чувствительности мутантов. Освеженная в Т-бульоне культура центрифугировалась при 3000 об/мин, осадок ресуспендировался в фосфатном буфере до титра 1×10^8 клеток в 1 мл. Облучение проводилось под лампой БУВ-30 на расстоянии 50 см при постоянном перемешивании. После облучения клетки высевались на чашки с Т-агаром и ставились на инкубацию при 37°.

Конъюгационное скрещивание и генерализованная трансдукция проводилась согласно методикам, описанным Миллером [2].

Способность мутантов образовывать филаменты после облучения проверялась микроскопически с применением фазового контраста.

Способность мутантов адсорбировать бактериофаг М59 проверялась по Адамсу [1].

Результаты и обсуждение. В предварительных опытах было обнаружено, что при смешанном высеве на поверхность агара бактериофага М59 с lon⁻ клетками в соотношении $10^3:10^7$ вырастает густой газон слизистых фагоустойчивых колоний. В связи с этим высевались бактерии из серийных разведений и отбор мутантов велся с чашек, где было не более 100 колоний. Частота выхода немукоидных фагоустойчивых колоний, определенная из трех независимых экспериментов, приведена в табл. 1.

Таблица 1. Частота выхода немукоидных фагоустойчивых мутантов у штамма Мук 154-2

Титр исходной культуры	Количество фагоустойчивых мутантов	Частота получения фагоустойчивых мутантов
0.85×10^8	4.1×10^6	
1.0×10^9	5.8×10^6	5.0×10^{-2}
1.0×10^8	5.2×10^6	

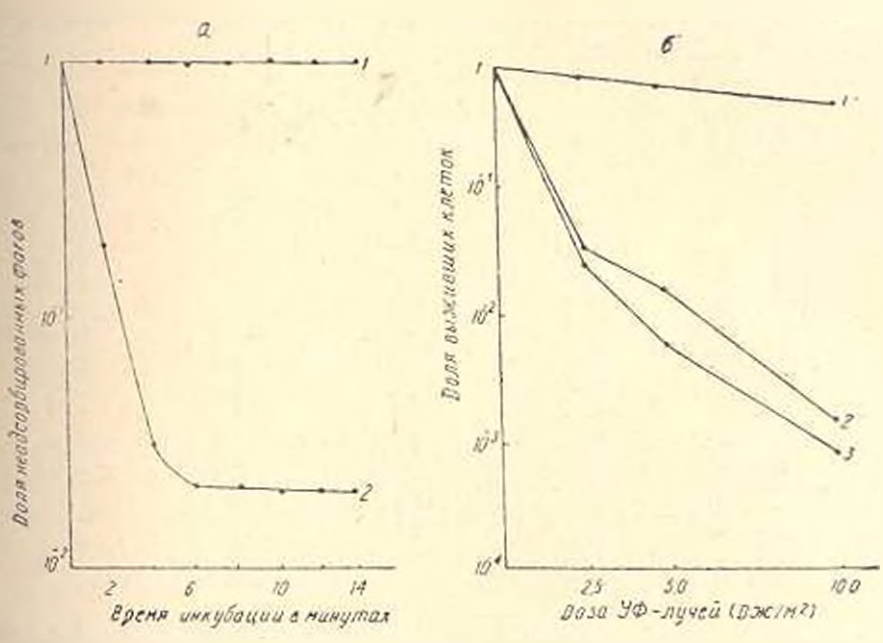
Часть мутантных клонов после 3—4-кратной очистки ревертирует к слизистому типу. Но даже с вычетом ревертантов получается очень высокая частота (5×10^{-2}) выхода неслизистых мутантов (табл. 1). При такой высокой спонтанной частоте мутирования к неслизистому фенотипу штаммы очень быстро вырождались бы. Однако тот же штамм Мук 154-2 находится в непрерывной работе более 15 лет, и в рассевах неслизистые колонии нами не были обнаружены. Для исключения штаммовой специфичности мы проверили lon⁻ штамм АВ 1899, полученный Говардом-Фландерсом и используемый во многих лабораториях мира [8]. Картина оказалась идентичной. Было сделано предположение о возможной лизогенизации бактериофагом М59 lon⁻ штаммов. Проверки наличия фага в спонтанных и УФ-облученных культурах неслизистых мутантов дали отрицательный результат. Не исключено, что в резком увеличении частоты выхода неслизистых мутантов определенную роль играет сам бактериофаг М59. Необходимо отметить, что при высеве бактерий и фагов двухслойным методом частота выхода резистентных мутантов очень низкая, менее 10^{-8}.

Для дальнейшего изучения нами были отобраны 17 стабильных неслизистых мутантов. Из литературных данных известно, что добавление маннозы в агаризованную среду приводит к образованию слизистых колоний у немукоидных мутантов [12, 13]. Из 17-ти отобранных

мутантов ни у одного при добавлении в среду маннозы колонии не становились слизистыми.

Проверялась кинетика адсорбции бактериофага М59 на клетках неслизистых мутантов и исходного штамма (рис.).

Как видно из рис. *а* у этих мутантов не происходит заметного снижения количества фагов, способных образовывать стерильные пятна. Это свидетельствует о том, что у них полностью прекращен биосинтез колановой кислоты, которая служит рецептором для адсорбции бактериофага М59.



а. Кинетика адсорбции фага М59 на немукоидных мутантах штамма Мук 154-2; 1—НМ-мутанты; 2—Мук 154-2. б. Кинетика УФ-гибели штаммов СА 154, Мук 154-2 и немукоидных мутантов. 1—СА 154, 2—Мук 154-2; 3—НМ-мутанты.

Одним из характерных признаков lon является высокая чувствительность к УФ-лучам. Мутанты были подвергнуты УФ-облучению, после чего определялась их выживаемость. Кривые выживаемости, построенные на основании результатов 3—5 опытов, представлены на рис., *б*.

Как видно, кривые выживаемости неслизистых мутантов имели характерную для lon⁻ мутантов форму. По чувствительности к УФ-лучам неслизистые мутанты превосходили исходный штамм Мук 154-2. Это можно объяснить тем, что полисахариды играют протекторную роль, защищая клетку от облучения [5]. В данном случае отсутствие биосинтеза колановой кислоты у мутантов делает их более уязвимыми к УФ-облучению. Микроскопический анализ показал, что клетки неслизистых мутантов, как и клетки исходного штамма, после облучения теряют способность к делению и удлиняются, образовывая филаменты. Сохранение высокой чувствительности к ультрафиолетовым лучам и об-

разование филаментов свидетельствует о том, что неслизистая морфология у них является результатом подавления обильного биосинтеза колановой кислоты супрессорными мутациями.

С целью локализации на генетической карте хромосомы E. coli супрессорных мутаций были поставлены эксперименты по конъюгационному скрещиванию неслизистых мутантов со штаммом J 62. Отбор рекомбинантов велся относительно пролинового и гистидинового маркеров, а также по морфологии колоний. Данные конъюгационного скрещивания приведены в табл. 2

Таблица 2. Отбор слизистых трансконъюгантов при скрещивании неслизистых мутантов с F^- штаммом J 62

Донорный штамм	Частота выхода слизистых трансконъюгантов, %		
	pro^+ muc^+	his^+ muc^+	pro^+ his^+ muc^+
НМ—1	47.8	1.7	10.0
НМ—8	48.0	0.9	3.7
НМ—9	50.1	2.0	6.0
НМ—19	24.2	0.9	4.0
НМ—20	32.8	13.2	19.1
НМ—25	29.5	3.1	11.5
НМ—39	39.0	0.4	3.0
НМ—41	39.4	0.9	4.5
НМ—44	51.0	1.5	5.2
НМ—50	43.3	1.4	5.3
НМ—53	53.8	3.9	8.5
НМ—54	15.7	11.9	19.2
НМ—56	45.8	33.4	11.3
НМ—67	22.5	0.9	2.2
Мух 154—2	52.0	32.0	18.2

Анализ трансконъюгантов показал, что среди pro^+ рекомбинантов около 50% имели слизистую морфологию колоний, в то время как среди his^+ рекомбинантов такой фенотип имели не более 3%. Исключение составляли трансконъюганты НМ-20, НМ-54 и НМ-56, у которых слизистые his^+ рекомбинанты составляли более 12%. Среди pro^+ his^+ рекомбинантов доля слизистых колоний возрастала в 2—4 раза, составляя для большинства мутантов 3—5%. Полученные данные свидетельствуют о том, что неслизистый фенотип всех мутантов является следствием внегенной супрессии. Резкое снижение слизистых вариантов среди his^+ рекомбинантов указывает на тесную сцепленность супрессорных мутаций с гистидиновым опероном.

С целью определения степени сцепленности супрессорных мутаций с his маркером были проведены опыты по генерализованной трансдукции фагом P1 vir. В качестве реципиента использовался штамм J 621. Отбор трансдуктантов производился по his маркеру, после чего определялась доля неслизистых вариантов (табл. 3).

Как видно из табл. 3, совместная трансдукция большинства супрессорных мутаций с his маркером составляет 30—40%, что свидетельствует об их тесной сцепленности и локализации на 45-й мин генетической карты E. coli.

Ранее в этой области были локализованы супрессоры, подавляющие слизистый фенотип lon⁻ мутантов [7, 15, 17]. Затрагивают ли эти мутации один ген или группу генов — этот вопрос пока остается невыясненным. Трислеру и Готтесману с помощью фага Мю и транспозона Tn 10 удалось показать пять генов, участвующих в регуляции биосинтеза колановой кислоты, которые также были локализованы на 45-й мин генетической карты. В этом районе генетической карты из

Таблица 3. Частота совместной передачи супрессоров мукоидности с гистидиновым маркером при трансдукции в штамм *J* 621

Донор	Общее количество трансдуктантов	Количество неслизистых трансдуктантов	Частота получения неслизистых трансдуктантов, %
НМ—1	593	140	23.6
НМ—8	341	136	39.9
НМ—9	346	148	42.8
НМ—19	449	184	40.8
НМ—20	67	9	11.9
НМ—25	643	255	39.7
НМ—39	246	105	42.6
НМ—41	119	44	36.8
НМ—44	163	70	42.0
НМ—50	107	38	32.5
НМ—53	310	148	47.7
НМ—54	173	50	29.9
НМ—56	209	75	35.7
НМ—67	296	96	29.4

генов, детерминирующих биосинтез мономеров колановой кислоты, находится ген фосфоманозоизомеразы [9, 12, 13]. Мутации в этом гене могут приводить к неслизистому фенотипу. Полученные нами мутации не затрагивают этот ген, так как добавление маннозы в питательную среду не приводит к образованию слизистых колоний.

Среди использованных методов выделения неслизистых мутантов lon⁻ штаммов приведенный в настоящей работе является самым эффективным. Применение бактериофага M59 не только позволяет вести прямой отбор мутантов по регуляции колановой кислоты, но и способствует резкому повышению частоты их выхода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адамс М.* Бактериофаги. М., 1961.
2. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
3. *Charette M. F., Henderson G. W., Markovitz A.* Proc. Natl. Acad. Sci., *78*, 4728—4732, 1981.
4. *Chung C. H., Goldberg A. L.* Proc. Natl. Acad. Sci., *78*, 4931—4935, 1981.
5. *Donch J., Greenberg J.* Mutat. Res., *10*, 153—155, 1970.
6. *Goebel W. F.* Proc. Natl. Acad. Sci., *49*, 464—471, 1963.
7. *Gottesman S., Trisler P., Torres—Cabassa A.* J. Bacteriol., *162*, 1111—1119, 1985.
8. *Howard—Flanders P., Simson E., Theriot L.* Genetics, *49*, 237—246, 1964.
9. *Hua S. S., Markovitz A.* J. Bacteriol., *110*, 1089—1099, 1972.
10. *Mackie G., Wilson D. B.* J. Biol. Chem., *247*, 2973—2978, 1972.
11. *Markovitz A.* In: Sutherland I. Surface Carbohydrates of the Procaryotic Cell. Academic Press., Inc., London, 415—462, 1977.
12. *Markovitz A., Liberman M. M., Rosenbaum N.* J. Bacteriol., *94*, 1497—1501, 1967.
13. *Markovitz A., Sydiskis R. J., Liberman M. M.* J. Bacteriol., *94*, 1492—1496, 1967.
14. *Mizusawa S., Gottesman S.* Proc. Natl. Acad. Sci., *80*, 358—362, 1983.
15. *Radke K. L., Siegel E. C.* J. Bacteriol., *106*, 432—437, 1971.
16. *Stirm S., Bessler W., Fehmel F., Freud—Molbert E., Thurow H.* Zentralblatt. Bacteriologischen Hygiene I. Abt. Orig., A *266*, 26—28, 1974.
17. *Trisler P., Gottesman S.* J. Bacteriol., *160*, 184—191, 1984.

Поступило 16.VII 1986 г.