

ВЛИЯНИЕ РИБОСОМНЫХ И РНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ МУТАЦИЙ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЛАЗМИДНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ lon⁻ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* K-12

Р. Г. ОГАНЕСЯН, А. А. БАРСЕГЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Биотехнологический центр при ЗИИ АН Армении, Ереван

Эффективность трансформации *E. coli* K-12 плазмидной ДНК у lon⁻ мутантов существенно ниже, чем у штаммов дикого типа. Были сконструированы двойные рекомбинанты, несущие lon⁻ мутацию в сочетании с различными аллелями РНК-полимеразного (rpoB) и рибосомного (rpsL) генов. Некоторые аллели этих генов повышают эффективность плазмидной трансформации lon⁻ штаммов в 3—10 раз, в предельном случае доводя ее до уровня таковой у исходной культуры.

Փլազմիդային ԳԼՔ-ով տրանսֆորմացիայի արդյունավետությունը lon⁻ մուտանտների մոտ, վայրի շտամների համեմատությամբ, զգալիորեն ցածր է: Ստեղծվել են երկակի ռեկոմբինանտներ, որոնք իրենց մեջ կրում են lon⁻ մուտացիայի տարբեր զուգորդումներ ԲՆԲ-պոլիմերազային (rpoB) և ռիբոսոմային (rpsL) գենների տարբեր ալելների: Շատ ԲՆԲ-պոլիմերազային և ռիբոսոմային գենների որոշ ալելները 3—10 անգամ բարձրացնում են պլազմիդային ԳԼՔ-ով lon⁻ մուտանտների տրանսֆորմացիայի արդյունավետությունը, մասնակի զեպրում այն խաղնկով ծեղղական կուլտուրայի մակարդակին:

Transformation efficiency of *E. coli* K-12 by plasmid DNA is essentially less for lon⁻ mutants than for wild type strains. Double recombinants carrying lon⁻ mutation in combination with variety alleles of RNA-polymerase (rpoB) and ribosome (rpsL) genes have been constructed. Some alleles of RNA-polymerase and ribosome genes about 3—10 times increase transformation efficiency of lon⁻ strains leading in the top case to a level of the same of the parent culture,

lon⁻ мутация—РНК-полимераза—рибосома—трансформация.

Одним из барьеров на пути создания эффективных систем экспрессии гетерологичных генов в бактериальных клетках является деградация продуктов клонированных генов. По-видимому, клеточная система протеолиза распознает белковые продукты чужеродных генов как аномальные (например, результат ошибок биосинтеза или посттрансляционной модификации, преждевременной терминирования трансляции или включения аналогов аминокислот) и подвергает их деградации. Этот барьер заметно снижает уровень экспрессии клонированных в *E. coli* генов [13]. Исходя из этого, мы предположили, что

при генно-инженерных работах по созданию штаммов-продуцентов особенную ценность могут представлять штаммы, дефектные по способности деградировать белки, воспринимаемые клеткой как аномальные.

Ранее было показано, что подобным свойством обладают lon^- мутанты [8]. Было установлено, что lon^- мутации увеличивают время полужизни аномальных для клетки белков [6, 10], и что именно lon ген-продукт, обладающий протеазной активностью [7], обуславливает в нормальной клетке высокую скорость деградации чужеродных белков. Поэтому мутации в гене lon снижают скорость деградации клеточных белков и полипептидов [11], что можно использовать для оптимизации генно-инженерных конструкций. В то же время известно, что lon^- штаммы проявляют дефектность и в наследовании экстрахромосомных факторов [9], что препятствует использованию описанного выше преимущества lon^- мутантов. Целью данной работы являлось исследование возможности преодоления барьера на пути переноса и (или) поддержания клонированной ДНК в lon^- культуре с сохранением ее дефектности по деградации чужеродных белков.

Материал и методика. Список исходных штаммов приведен в табл. 1.

В качестве реципиентов использовали исходные культуры CA154 и JC335. Штамм A200 получен следующим образом: lon^- мутацию из штамма мук. 154-2 (полученного в результате спонтанной мутации в lon гене штамма CA154) пере-

Таблица 1. Исходные штаммы, использованные в работе

Бактериальные штаммы	Генотип	Источник получения
CA 154	$\text{Hfr lacI}^- \text{lacZ}^- \text{thi}^-$	Получен от С. Бреннера
мук 154 - 2	$\text{Hfr lon}^- \text{lacI}^- \text{lacZ}^- \text{thi}^-$	Получен нами
29-180*	$\text{Hfr lacZ}^- \text{thi}^- \text{supE}^- \text{rpsL}^- 29$	Получен от И. И. Барегаяна
77-180*	$\text{Hfr lacZ}^- \text{thi}^- \text{supE}^- \text{rpsL}^- 77$	Получен от И. И. Барегаяна
JC 335	$\text{F}^- \text{leu}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{metB}^-$	Получен от Дж. С. Флакся
A 200	$\text{F}^- \text{lon}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{metB}^-$	Получен нами
CH.r 2*	$\text{F}^- \text{trp}^- \text{rpsL}^- \text{arg}^- \text{supE}^- \text{groB}^- 402$	Получен от А. В. Арутюняна
CH.r 3*	$\text{F}^- \text{trp}^- \text{rpsL}^- \text{arg}^- \text{supE}^- \text{groB}^- 403$	Получен от А. В. Арутюняна
CH.r 23*	$\text{F}^- \text{trp}^- \text{rpsL}^- \text{arg}^- \text{supE}^- \text{groB}^- 423$	Получен от А. В. Арутюняна

Примечание. знаком * отмечены штаммы-доноры РНК-полимеразных и рибосомных генов в экспериментах по трансдукционному переносу.

носили путем конъюгации в культуру JC335. Для этого культуры донора и реципиента, находящиеся в экспоненциальной фазе роста ($1 \cdot 10^8$ кл/мл) смешивали в соотношении 1:5 и помещали в водяную баню на 37° . Инкубацию вели в течение часа, что достаточно для передачи lon области. Конъюгацию прерывали и производили высев культуры на синтетическую среду M9 [3]. Рекомбинанты отбирали среди leu^- эксконъюгантов по муконидной морфологии.

Перенос groB -аллелей осуществляли путем трансдукции фагом P1 vir [4]. Трансдукционный перенос rpsL -аллелей проводили с использованием фазы P1_{ks} по тому же методу, а отбор трансдуктантов, в связи с доминантностью дикого аллеля на мутантным,—по методу Лебоа [12].

Трансформацию бактерий проводили по методу Мандела [3]. В качестве трансформирующего агента использовали плазмиду pBR322. Поскольку способность к трансформации у бактерий в значительной мере зависит от фазы роста клеток, все эксперименты по трансформации выполняли с культурами, находящимися в одной и той же среднегеометрической фазе роста. Трансформанты отбирали по способности расти на среде, содержащей ампициллин и тетрациклин. Эффективность трансформации определяли как число образовавшихся трансформантов по отношению к исходному числу жизнеспособных клеток. Количество трансформирующей ДНК во всех экспериментах оставалось постоянным. Результаты экспериментов обрабатывали на компьютере «Apple II» по прикладной программе, составленной в нашей лаборатории.

Результаты и обсуждение. В обеих сериях экспериментов эффективность трансформации *E. coli* плазмидной ДНК у lon^+ мутантов была существенно ниже, чем у исходных культур (в 10 раз при сравнении мук 154-2 с СМ154 и в 160 раз при сравнении А200 с JC335).

Ранее нами было показано, что мутации в генах основных компонентов белоксинтезирующего аппарата клетки, а именно, РНК-полимеразы и рибосом, влияют на такие признаки проявления lon гена, как синтез полисахаридов [5], клеточное деление и радиочувствительность [1, 2]. Исходя из этого, мы предположили возможность влияния этих мутаций и на эффективность плазмидной трансформации lon -штаммов *E. coli*. Для проверки такой возможности были сконструированы двойные рекомбинанты, несущие lon -мутацию в сочетании с различными аллелями *grsI* и *groV* генов. Характеристика сконструированных штаммов приведена в табл. 2.

Таблица 2. Сконструированные штаммы

Бактериальные штаммы	Генотип
М — с29	Hfr $\text{lon}^- \text{lacI}^- \text{lacZ}^- \text{thr}^- \text{grsI}^- 29$
М — с77	Hfr $\text{lon}^- \text{lacI}^- \text{lacZ}^- \text{thr}^- \text{grsI}^- 77$
А — p2	F $^- \text{lon}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{groB402}$
А — p4	F $^- \text{lon}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{groB403}$
А — p23	F $^- \text{lon}^- \text{his}^- \text{arg}^- \text{groB423}$

Вновь сконструированные штаммы, исходные культуры и их lon^+ мутанты были трансформированы плазмидной ДНК. Результаты экспериментов (рис.) позволяют сделать вывод о том, что рибосомные и РНК-полимеразные мутации по-разному влияют на эффективность плазмидной трансформации lon -штаммов *E. coli* K-12. Так, если аллели РНК-полимеразного гена *groV* повышают способность к трансформации lon -штаммов в 3—5 раз, то аллели рибосомного гена *grsL* — в 6—10 раз. В случае с аллелем *grsL77* эффективность трансформации повышается до уровня такового у исходного lon -штамма.

Сравнительный анализ некоторых характеристик (табл. 3) позволяет сделать следующие предположения: во-первых, внесклеточные полисахариды, повышенный уровень синтеза которых характерен для lon -культур, по-видимому, не оказывают существенного влияния на способность клеток к трансформации. Действительно, РНК-поли-

меразные мутанты А-р2 и А-р3, резко отличающиеся друг от друга по количеству синтезируемых ими внеклеточных полисахаридов, характеризуются почти равной эффективностью трансформации. Во-вторых, наблюдается положительная корреляция между радиоустойчивостью и эффективностью трансформации рибосомных мутантов М-с29 и М-с77. Так, штамм М-с77, характеризующийся почти равной с родительской культурой радиоустойчивостью, приближается к исходному штамму и по значению эффективности плазмидной трансформации.



Влияние РНК-полимеразных (а) и рибосомных (б) мутаций на способность к трансформации 100^+ мутантов *E. coli* К-12: 1а—IC325 ($5,0 \cdot 10^{-4}$), 2а—А200, ($3,1 \cdot 10^{-4}$), 3а—А-р2 ($1,4 \cdot 10^{-4}$), 4а—А-р3 ($1,5 \cdot 10^{-4}$), 5а—А-р23 ($1,1 \cdot 10^{-4}$), 16—СА154 ($1,2 \cdot 10^{-4}$), 26—мук154-2 ($1,3 \cdot 10^{-4}$), 36—М-с29 ($8,8 \cdot 10^{-4}$), 45—М-с77 ($1,1 \cdot 10^{-4}$), (в скобках даны абсолютные значения эффективности плазмидной трансформации).

Таблица 3 Сравнительная характеристика исследуемых штаммов

Бактериальные штаммы	ВПС-синтезирующая способность	Радиоустойчивость	Эффективность трансформации
IC335	+	++++	++++
А200	++	++	+
А-р2	++	++	+++
А-р3	++++	+	++
А-р23	++	+	++
СА154	+	++	+++
мук154-2	+	+	++
М-с29	++	+++	+++
М-с77	++	++++	+++

Примечание: + — очень низкое значение, ++ — низкое значение, +++ — среднее значение, ++++ — высокое значение.

Изложенные в настоящей работе экспериментальные данные свидетельствуют о том, что рибосомные мутации, по-видимому, являются более перспективными для повышения эффективности трансформации юп-мутантов, чем РНК-полимеразные мутации. Сконструированный штамм М-с77, для которого характерны дефектность по протеазной активности в отношении чужеродных белков и высокая способность к трансформации, что особенно ценно на начальных этапах создания генно-инженерных систем, может быть рекомендован для использования в биотехнологических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсегян А. А., Оганесян Г. Г. Биолог. журн. Армении, 35, 1136—1141, 1983.
2. Барсегян А. А., Оганесян Г. Г., Оганесян М. Г. Биолог. журн. Армении, 35, 479—484, 1983.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Молекулярное клонирование, М., 1984.
4. Миллер Дж. В кн.: Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
5. Оганесян Г. Г., Барсегян А. А., Оганесян М. Г. Биолог. журн. Армении, 36, 398—404, 1984.
6. Рыжовская А. С., Кайдалов Н. В., Анухин Ю. М., Клячко Е. В., Лилищ В. А., Стронгин А. Я. Молекуляр. биология, 22, 201—208, 1988.
7. Chung C. H., Goldberg A. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 78, 4931—4935, 1981.
8. Gottesman S., Zipser D. J. Bacteriol., 133, 844—857, 1978.
9. Falkinham III J. O. J. Bacteriol., 139, 1051—1057, 1979.
10. Kowit J. D., Goldberg A. L. J. Biol. Chem., 257, 4187—4195, 1982.
11. Larimore F. S., Waxman L., Goldberg A. L. J. Biol. Chem., 257, 4187—4195, 1982.
12. Leboy P. S., Cox D. C., Flaks J. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52, 1367—1374, 1964.
13. Remaut E., Stanssens P., Fiers W. Nucleic Acids Res., 11, 4677—4688, 1983.

Получено 24.VIII 1989 г.

Биолог. журн. Армении, № 9 (43), 1990

УДК 575.324.23:599.9

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МОДИФИКАЦИИ ДЕЙСТВИЯ МУТАГЕНОВ В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Р. М. АРУТЮНЯН, Л. Г. АБРАМЯН, Т. Ф. САРКИСЯН, Т. Ф. ЗАСУХИНА,
Г. Д. СЕРЕДЕННИ, А. Д. ДУРНЕВ

Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии,
Институт общей генетики АН СССР, Москва,
НИИ фармакологии АМН СССР, Москва

Исследованы различия в модификации мутагенного действия фотрина и диоксилина природными и синтетическими протекторами по тестям вилочкового синтеза ДНК, включения четки в ДНК и возникновения одноклеточных разрывов в ДНК на культуре лимфоцитов периферической крови человека.

Հետազոտված են ֆոտրինը և դիօքսիլինը մուտագեն ազդեցության տարբեր մոդիֆիկացիաները մարդու ակտիվների արյան լիմֆոցիտների (պոլիոմերազ) վրա բնական և օրգանիկ պրոտեկտորների ազդեցությամբ առանձնացված և ժամկետային ախտերով ՉՆԲ-ի արտապլանային օրգանի ՉՆԲ-ի մեջ ՅՈՒ-թիմոցինի նյութի կուտակումը և մեկ բնական ՉՆԲ-ի կարգումների առաջացումը:

Сокращения: ГАП — гидроксипатит, ТХУ — трихлоруксусная кислота, ДРИ-ДНК — репарационный индекс.