

УДК 577.1 : 577.15 : 576.851.575

БИОХИМИЯ

Ж. А. Кцоян, Н. Н. Саркисян, К. А. Аракелова

Ассоциация активности ДНК-полимеразы типа I с R-плазмидой
 pGK-101 *S. derby*

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 14/XI 1978)

Поиск новых генов, ассоциированных с внехромосомными ДНК в бактериях и высших организмах, и выяснение их функционального значения в настоящее время продолжает оставаться в центре внимания (1). Большой практический и общенаучный интерес, в частности, представляет изучение плазмид, влияющих на резистентность клеток к излучениям и на мутационный процесс (2). Ранее нам удалось показать присутствие в *S. derby* K 89 и его радиочувствительных мутантах R-фактора, придающего клеткам устойчивость к стрептомицину, пенициллину и хлорамфениколу, и лишь один из этих мутантов—K 82 pol⁻ был чувствителен к этим антибиотикам, т. е. не содержал R-фактора (3).

В настоящей работе изучалась трансмиссибельность и стабильность R-фактора, обозначенного pGK-101, проводился конъюгационный перенос R-плазмиды, при котором выявлена ассоциация активности репаративной ДНК-полимеразы типа I с R-плазмидой.

В работе использовали дикий тип *S. derby* K 89 и выделенный нами его радиочувствительный мутант K 82 pol⁻, *E. coli* C и *S. typhimurium* LT2. Характеристика: *S. derby* K 89—прототроф, Stm^r, Pen^r, Cml^r, Tet^r; *S. derby* K 82—arg⁻, his⁻, Stm^s, Pen^s, Cml^s, Tet^s; pol⁻; *S. typhimurium* ZT2—прототроф, Stm^s, Pen^s, Cml^s, Tet^s, и *E. coli* C—прототроф, Stm^s, Pen^s, Cml^s, Tet^s. Проверка на резистентность к антибиотикам последних двух штаммов проведена в одинаковых условиях со штаммом *S. derby*.

Штаммы выращивали на полиоценной среде (2% МПА). Конъюгационные скрещивания проводили по методу Дэтта с соавт. (4). Конъюгационную смесь инкубировали в течение 3 и 18 часов при 37°C. Частоту R-переноса определяли по отношению трансконъюгантов к количеству донорских клеток. В качестве минимальной среды использовали М-9 (5) в опытах конъюгационного скрещивания. Антибиотики в опытах по конъюгации использовали в следующих концентрациях (мкг/мл): тетрациклина гидрохлорид—20, стрептомицин сульфат—200, пени-

циллин натриевая соль — 20, хлорамфеникол — 20. Для выделения ДНК-полимеразы использовали биомассу *S. derby* К 89, мутанта К 82 rol^- и пяти трансконъюгантов К 821, К 822, К 823, К 824, К 825. Активность ДНК-полимеразы определяли в стандартных условиях (6) с использованием "активированной" ДНК из спермы лосося (в качестве затравки-матрицы), 5-дезоксинуклеозидтрифосфатов фирмы „Reanal“ (Венгрия), H^3 ТТР фирмы „Amersham“ (Англия). Полная реакционная смесь в 1,75 мл содержала (в мкм): ДНК — 800, АТР — 3,8, 9ТР — 12,3, СТР — 44, H^3 ТТР — 12, $MgCl_2$ — 30, буфер РНХ — 80. Радиоактивность считали в счетчике „Intertchnique“ (Франция).

Из данных табл. 1 явствует, что путем конъюгационного скрещивания осуществлен перенос R-плазмиды из клеток дикого типа *S. derby* К 89 к мутантным клеткам *S. derby* К 82 rol^- реципиентам. Частота конъюгационного переноса варьировала от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ в зависимости от маркера селекции. Таким образом удалось выявить в *S. derby* К 89 трансмиссибельный R-фактор, контролирующий устойчивость к стрептомицину, пенициллину, хлорамфениколу, обозначенный нами как рGК-101. Была проверена возможность передачи R-плазмиды из *S. derby* в *S. typhimurium* и *E. coli* С. Конъюгационный перенос осуществлен, хотя частота скрещивания *S. derby* × *E. coli* и *S. derby* × *S. typhimurium* была на 1–2 порядка ниже, чем при скрещивании *S. derby* × *S. derby* (табл. 1), т. е. перенос плазмиды из *S. derby* в *S. typhimurium* и *E. coli* менее эффективен. С целью определения стабильности плазмиды трансконъюганты проверялись на устойчивость к антибиотикам: стрептомицину, пенициллину, хлорамфениколу. Все трансконъюганты подобно клеткам дикого типа были резистентны к антибиотикам. Анализ трансконъюгантов показал, что плазида рGК-101 *S. derby* трансмиссибельна и стабильна.

Таблица 1

Конъюгационный перенос плазмиды рGК 101 *S. derby*

Скрещивание	Селекция транс-конъюгации по устойчивости к антибиотикам	Частота конъюгационного переноса		Чувствительность трансконъюгантов к антибиотикам			
		инкубация, часы		Stm	Pen	Cml	Tel
		3	18				
<i>S. derby</i>	Stm	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$	г	г	г	г
×	Pen	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	г	г	г	г
<i>S. derby</i>	Cml	$4 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	г	г	г	г
<i>S. derby</i>	Stm	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	—	—	—	—
×	Pen	$1 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	Cml	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	—	—	—	—
<i>S. derby</i>	Stm	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	—	—	—	—
×	Pen	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	Cml	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	—	—	—	—

Средние данные из 6 опытов, г — резистентность.

Мутант *S. derby* K 82 pol^- , который служил реципиентом в опытах по конъюгационному скрещиванию, в стандартных условиях для определения активности ДНК-полимеразы I в ультразвуковых экстрактах содержал менее 5% ДНК полимеразы по сравнению с экстрактами из дикого типа и других радиочувствительных мутантов (табл. 2), и лишь мутант K 82 pol^- оказался чувствительным к стрептомицину, пенициллину, хлорамфениколу, т. е. не содержал плазмиды $\text{pGK}-101$ (9). Эти данные указывают на то, что ген ДНК-полимеразы типа I в *S. derby* может быть локализован на плазмиде. Действительно, перенос плазмиды $\text{pGK}-101$ из *S. derby* K 89 в K 82 pol^- с помощью конъюгации приводил к почти полному восстановлению активности ДНК-полимеразы в экстрактах их трансконъюгантов (табл. 2). Из 5 проверенных трансконъюгантов все 5 содержали 90–95% активности ДНК-полимеразы. Перенос плазмиды в мутант K 82 pol^- , наряду с восстановлением активности ДНК-полимеразы, приводит к существенному повышению резистентности клеток к УФ-свету.

Кривые выживаемости двух трансконъюгантов изображены на рис. 1.

Таблица 2

Содержание ДНК-полимеразы типа I в *S. derby*

Штаммы	Активность ДНК-полимеразы I (импульсы за 10 сек)
<i>S. derby</i> K 89	1411
<i>S. derby</i> K 82	65
Трансконъюганты	
<i>S. derby</i> K 821	1250
<i>S. derby</i> K 822	1375
<i>S. derby</i> K 823	1193
<i>S. derby</i> K 824	1490
<i>S. derby</i> K 825	1338

Количество белка I $\mu\text{г}/\text{мл}$ во всех опытах.

По-видимому, бесплазмидные штаммы *S. derby* не содержат хромосомного гена ДНК-полимеразы типа I и не способны нормально проводить репаративный синтез во время эксцизионной репарации.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что присутствие ДНК-полимеразы типа I в клетках *S. derby* строго ассоциировано с наличием плазмиды $\text{pGK}-101$.

Результаты, приведенные в настоящей работе, хорошо согласуются с данными о ДНК-полимеразах, кодируемых генами плазмид R-Utrecht на *S. typhimurium* (7–9) и R-фактор pMG^R из *Ps. aeruginosa* (10), и показывают, что ассоциация ДНК-полимеразного гена с внехромосомным ДНК довольно широко распространена у бактерий и имеет существенное значение в определении их резистентности

к генетически активным агентам. Существенное отличие результата, полученного в настоящей работе, от указанных выше в том, что в *S. derby* плазмидная ДНК-полимераза типа I является основной репарационной ДНК-полимеразой, а хромосомная либо отсутствует,

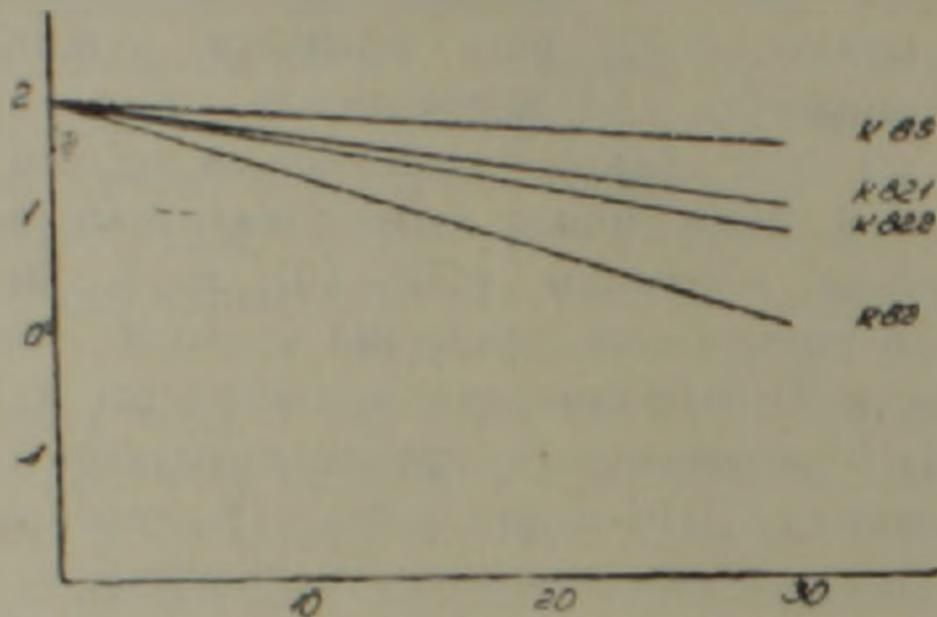


Рис. 1. Зависимость выживаемости клеток от дозы облучения. По оси ординат — выживаемость клеток. По оси абсцисс — время облучения в секундах. К 89 — диккий тип, К 82 — *pol*-мутант, К 821, К 822 — трансконъюганты

либо составляет лишь минорную фракцию. В случае *S. typhimurium* и *Ps. aeruginosa* плазмидная ДНК-полимераза выявляется лишь в мутантах, дефектных по хромосомному гену ДНК-полимеразы типа I. В литературе нам не удалось найти примера почти полного вынесения гена одного из важных факторов эксцизионной репарации — ДНК-полимеразы типа I — на плазмиду.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ճ. Ս. ԿՈՌՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԿԻՍՅԱՆ, Կ. Ա. ԱՐԱԿԵԼՈՎԱ

ԴՆԹ-պոլիմերազա I-ի ակտիվության գուգորդումը *S. derby*-ի pGK-101 R-պլազմիդայի հետ

Ուսումնասիրվել է R-ֆակտորի (որը անվանվել է մեր կողմից pGK-101 պլազմիդա) փոխհաղորդումը և կայունությունը *S. derby*-ի բջիջներում, որը հաղորդում է բջիջներին անտիբիոտիկների՝ ստրեպտոմիցին, պենիցիլին, ջլորամֆենիկոլ, նկատմամբ կայունություն:

Իրագործված է կոնյուգացիոն փոխանցում, որի դեպքում հայտնաբերված է ուպարացիոն ԴՆԹ-պոլիմերազա I-ի ակտիվության գուգորդումը pGK-101 պլազմիդայի հետ:

Աշխատանքում օգտագործվում են *S. derby*-ի վայրի K-89 շտամը և ուղիորդայուն K-82 *pol* մուտանտը, կոնյուգացիոն խաչածեղումները կատարվել են

Ինտտայի մեթոդով ԴՆԹ-ի պոլիմերազա 1-ի ակտիվությունը որոշվել է ԴՆԹ-ի պոլիմերազի որոշման ստանդարտ պայմաններում, օգտագործելով որպես մատրիցա սաղմոնի սպերմից անջատած «ակտիվացված» ԴՆԹ:

Ստացված տվյալները թույլատրում են ենթադրել, որ պլազմիդային ԴՆԹ-պոլիմերազա 1-ը *S. derby*-ում հանդիսանում է սեպարացիոն հիմնական ԴՆԹ-պոլիմերազան, իսկ բրոմոստոմոյինը կամ բացակայում է, կամ՝ կազմում մինորային ֆրակցիա:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Ի Բ Ա Կ Ա Լ Ե Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ Richard P. Novick, Royston C. Clowes et. all, Bacteriol. Reviews, vol. 40, N1, 168-189 (1976). ² D. G. MacPhee, Mutation Research, vol. 19, 375 (1973). ³ Ж. А. Кцоян, К. А. Аракелова, «Биол. журнал Армении», № 8, 1978. ⁴ N. Datta, R. W. Hodges, E. I. Shaw et all, G. Bacteriol., vol. 108, 1244 (1971). ⁵ N. S. Willets, D. I. Finnegan, Genet. Res. Camb., vol. 16, 113 (1970). ⁶ M. Gester, Progr. Nucl. Acid Research, vol. 14, 101 (1974). ⁷ D. G. MacPhee, Mutation Research, vor. 14, 150-453 (1972). ⁸ D. G. MacPhee, Mutation Research, vol. 18, 367 (1973). ⁹ D. G. MacPhee, Nature, London, vol. 251, 432 (1974). ¹⁰ P. Lehrbach, A. N. C. Kung, B. O. Lee, Gornal of General Microbiology, vol. 98, 167 (1977).