

УДК 577.1; 577.15; 576.851.575

БИОХИМИЯ

Н. Н. Саркисян, Р. Г. Антоян, Ж. А. Кцоян

Ступенчатое восстановление активности ДНК-полимеразы в pol^{-} штамме *Salmonella derby* при введении трансмиссбельного R-фактора

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 23/X 1981)

В нашем предыдущем сообщении (¹) приводились данные, свидетельствующие об ассоциации ДНК-полимеразы с трансмиссбельным R-фактором $pgk-101$ *Salm. derby*. Доказательства этой ассоциации сводились к тому, что конъюгативный перенос R-фактора в дефектный по ДНК-полимеразе реципиент *Salm. derby* К 82 pol^{-} восстанавливал УФ-резистентность и уровень активности ДНК-полимеразы в грубых экстрактах эксконъюгантов. Аналогичные данные на других объектах были ранее использованы как доказательства существования в составе природных плазмид генов ДНК-полимераз (²⁻⁴).

Поскольку данные о комплементации pol^{-} мутаций в эксконъюгантах допускают альтернативные интерпретации, вопрос об ассоциации гена-полимеразы с плазмидой $pgk-101$ требует дополнительного, более детального исследования, результаты которого и приводятся в настоящей статье. В работе, кроме более тщательного исследования эксконъюгантов, изучался уровень активности ДНК-полимеразы в штаммах, в которых плаزمида $pgk-101$ была элиминирована бромистым этидием, и в штаммах, полученных из pol^{-} мутанта путем трансформации изолированной плазмидной ДНК.

В работе использовали диккий тип *S. derby* К 89, выделенный нами его радиочувствительный мутант К 82 pol^{-} , К 82 $pol^{-} Rif^r$, К 82 $pol^{-} Rif^r$ Е. coli 86 pol^+ А., характеристика которых дана в (¹), а также рифампицин—100, налидиксовая кислота—100.

Конъюгационные скрещивания проводили по методу Детта с соавт. (⁵). Конъюгационную смесь инкубировали при 37° 18 час. Проводился отбор эксконъюгантов при 3-х генерациях на селективных средах с антибиотиками (¹) и минимальной среде для отбора ауксотрофных эксконъюгантов.

Элиминирование плазмиды осуществляли обработкой клеток *S. derby* К 89 в количестве 10^2 кл./мл бромистым этидием в концентрации 100 мкг/мл. Обработанные клетки инкубировали при 37° 18 час, а затем высевали на чашки без антибиотиков. Выжившие клетки, которые составляли 30%, высевали на селективные чашки с антибиотиками для отбора излеченных от плазмиды клеток, число которых

составляло 10%, а также на минимальную среду. ДНК плазмиды K 89 *S. derby* выделяли методом получения осветленных лизатов (6).

Опыты по трансформации ДНК плазмиды проводили компетентными клетками K 82 pol⁻ *S. derby*. (7). В 0,1 мл клеточной суспензии в количестве 10² кл./мл вносили препарат ДНК 100 мкг/мл по 0,01 мл и инкубировали сначала на холоду 10', а затем при 37° 60'. После инкубации клетки высевали по 0,5 мл на контрольные чашки без антибиотиков и на селективные чашки с антибиотиками Cm и Tc. Полученные трансформанты проверяли в последующих 3-х генерациях на устойчивость к антибиотикам и на ауксотрофность. Активность ДНК-полимеразы определяли в стандартных условиях (8) с использованием «активированной» ДНК из спермы лосося (в качестве затравки-матрицы), 5-дезоксинуклеозидтрифосфатов фирмы «Reanal» (Венгрия), H³TTP фирмы «Amersham» (Англия). Радиоактивность считали в счетчике «Intertechnique» (Франция).

Из данных табл. 1 видно, что при более детальном исследовании во время конъюгационных скрещиваний K 89×82 по маркерам CmTc и CmNal были отобраны 2 класса эксконъюгантов: ауксотрофы и прототрофы, при этом частота ауксотрофов на 2 порядка ниже таковой у прототрофов, однако все эксконъюганты сохраняли устойчивость к антибиотикам, свойственным как донору, так и реципиенту. При этом у ауксотрофов, которые, очевидно, являются дериватами K 82, происходит лишь частичное, 50%-ное восстановление активности ДНК-полимеразы, а у прототрофных эксконъюгантов полностью восстанавливается активность ДНК-полимеразы (табл. 1). В скрещиваниях *S. derby* K 89×*E. coli* 86 pol A, где Tc^r — маркер имеет заведомо хромосомную локализацию, также были выявлены среди эксконъюгантов помимо прототрофов и ауксотрофы.

Таблица 1

Конъюгационный перенос плазмиды pgk-101 и определение активности ДНК-полимеразы

Скрещивания	Селекция конъюгантов по устойчивости к антибиотикам	Число проверенных эксконъюгантов	Устойчивость к антибиотикам						Минимальная среда	Активность ДНК-полимеразы
			Cm	Sm	Pn	Nal	Rif	Tc		
K 82×K 82	Cm Tc	125	+	+	+	-	-	+	+	1885
K 89×K 82 ^{Nal}	Cm Nal	3	+	+	+	-	-	+	+	960
K 89×K 82 ^{Nal}	Cm Nal	100	+	+	+	+	-	+	+	1570
K 89×K 82 ^{Rif}	Cm Rif	2	+	+	+	+	-	+	+	280
K 89×K 82 ^{Rif}	Cm Rif	110	+	+	+	-	+	+	+	1750
K 89× <i>E. coli</i> 86	Cm Tc	0	-	-	-	-	-	-	-	-
K 89× <i>E. coli</i> 86	Cm Tc	117	+	+	+	-	-	+	+	1800
Контроль		2	+	+	+	-	-	+	-	400
<i>S. derby</i>	K 89		+	+	+	-	-	-	+	2000
K 82			-	-	-	-	-	+	-	80
K 82 ^{Nal}			-	-	-	+	-	+	-	100
K 82 ^{Rif}			-	-	-	-	+	+	-	80
<i>E. coli</i> 86 ^{Tc}			-	+	+	-	-	+	-	160

В табл. 2 представлены данные опытов по трансформации клеток К 82 pol^- — суммарной плазмидной ДНК из К 89 *S. derby*, в которых наблюдалось аналогичное расщепление на трансформанты—ауксотрофы и прототрофы. Эти результаты показывают, что прототрофные эксконъюганты действительно возникают вследствие переноса плазмиды из клеток К 89 в клетки К 82 pol^- , что подтверждается также скрещиваниями *S. derby* К 89×К 82^{nat} pol^- (табл. 1). Устойчивость к налидиксовой кислоте—это заведомо хромосомный маркер, в отличие от Тс', природа и происхождение которого в клетках *S. derby* К 82 пока остается неясной.

Таблица 2
Трансформация плазмидной ДНК в pol^- , штамм *S. derby*,
и активность ДНК-полимеразы

Число трансформантов в 1 мл	Маркер		Рост на min среде	Активность ДНК-поли- меразы в трансформан- тах (импульсы за 60)
	Сm	Тс		
30 20 10	+	+	+	1900: 2000 750: 1000
Контроль	+	+	+	
<i>S. derby</i> К 89	+	—	+	2000
<i>S. derby</i> К 82	—	+	—	80

Элиминация плазмиды бромистым этидием приводит к потере антибиотикоустойчивости и способности расти на минимальной среде, т. е. к ауксотрофности, по крайней мере у большинства популяций, а также к одновременной потере активности ДНК-полимеразы (табл. 3). В то же время данные таблицы свидетельствуют о возможности расщепления признаков.

Таблица 3
Характеристика излеченных клеток
К 89 *S. derby* и активность ДНК-полимеразы

Штамм	Сm	Pn	Sm	Тс	min среда	Активность ДНК-поли- меразы
К 89— 6	—	—	—	—	—	150
К 89—40	—	+	—	—	+	1650
К 89—12	—	—	—	—	+	140
К 89—29	—	—	—	+	—	190
Контроль						
К 89	+	+	+	—	+	2000
К 82	—	—	—	+	—	80

Совокупность изложенных результатов строго свидетельствует о том, что восстановление активности ДНК-полимеразы в pol^- мутанте *S. derby* К 82 действительно связано с появлением в этих клетках плазмиды, вводимой либо путем конъюгации, либо путем трансформации из клеток К 89 *S. derby*.

Ступенчатое восстановление активности ДНК-полимеразы в pol^- штамме *S. derby* и расщепление изучаемых признаков—антибиотикоустойчивости и способности расти на минимальной среде, имеют место, по-видимому, в связи с тем, что в процессе роста клеток К 89 в бромистом этидиуме или при конъюгации или трансформации полная

плазмида может диссоциировать по крайней мере на 3 компонента, которые несут разные маркеры. Один из этих компонентов, вероятно, содержит структурный ген, отвечающий за активность ДНК-полимеразы, другой—трансдействующий модулятор гена, что в принципе может объяснить ступенчатое восстановление активности ДНК-полимеразы в прототрофных и ауксотрофных клетках К 82, в которые принесена плазмида. На возможность диссоциации исходной полной плазмиды, присутствующей в *S. derby* К 89, указывают данные Захаряна и др. (9).

Изложенное может быть проверено после разделения различных компонентов электрофоретически и проведения трансформации раздельно каждым компонентом.

О природе структурного гена можно высказать следующие предположения. Во-первых, как и предполагалось ранее (1), возможно, что в случае с плазмидой *pgk 101 S. derby* мы имеем дело со структурным геном ДНК-полимеразы типа I *E. coli*, несущей в основном репарационные функции и вынесенной на плазмидный репликон в природном штамме *S. derby* в силу каких-то селективных преимуществ. Во-вторых, возможно, что данная плазмида несет какой-то супрессор хромосомной *pol*-мутации, например, *amber*-супрессор, если хромосомная *pol*-мутация является *amber*-мутацией. Для решения этого вопроса в случае с *S. derby* необходимы дальнейшие эксперименты.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ն. Ն. Սարգսյան, Ռ. Գ. Անտոնյան, Ժ. Ա. Կծոյան

S. derby-ի *pol*-շտամում ԴՆԹ-պոլիմերազայի ակտիվության աստիճանական վերականգնումը R—ֆակտորի փոխհաղորդման դեպքում

Ներկա աշխատանքում կատարվել է էքսկոնյուգանտների մանրակրկիտ ուսումնասիրություն, որոշվել է ԴՆԹ-պոլիմերազայի ակտիվությունը այն շտամներում, որոնցում պլազմիդան էլիմինացվել է էթիդիում բրոմիդով և այն շտամներում, որոնք ստացվել են *pol*-մուտանտից՝ պլազմիդային ԴՆԹ-ի տրանսֆորմացիայի միջոցով:

Ստացված արդյունքները վկայում են, որ *S. derby* К 82 *pol*-մուտանտի մոտ ԴՆԹ-պոլիմերազայի ակտիվության վերականգնումն իրոք կապված է այդ բջիջներում պլազմիդայի փոխհաղորդման հետ՝ կամ կոնյուգացիայի, կամ տրանսֆորմացիայի միջոցով:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 Ж. А. Кцоян, Н. Н. Саркисян, К. А. Аракелова, ДАН АрмССР, т. 68, № 5 (1979). 2 D. G. Mac Phee, Mutation Research, vol. 19, 353 (1973). 3 D. G. Mac Phee, Nature, London, vol. 251, 432 (1974). 4 P. Lehrbach, A. W. C. Kung, B. O. Lee, The Journal of General Microbiology, vol. 98, 167 (1977). 5 W. Datta, R. W. Hodges, E. J. Shaw et al., J. Bacteriol., vol. 108, 1244 (1971). 6 P. Guerri et al., J. Bacteriol., vol. 116, 1064 (1973). 7 M. Dagert, S. D. Ehrlich, Gene, vol. 6, 23 (1979). 8 M. Gefter, Progr. Nucl. Acid Research, vol. 14, 101 (1974). 9 А. Ф. Казанчян, М. К. Вартанян и др., Биол. журнал Армении, т. 34, № 3 (1981).