

УДК 577.1 : 577.15 : 576.851

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Р. Г. Антонян, К. Г. Данагулян, Н. Н. Саркисян, Ж. А. Кцоян

Радиорезистентные, дефектные по ДНК-полимеразе
 типа I штаммы *Salmonella derby* К 89

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 28/XII 1982)

Из литературы известно, что введение R-плазмид в клетку бактерий приводит к значительному повышению радиорезистентности, к усилению мутагенной репарации, увеличению спонтанной и индуцированной мутабельности в клетках дикого типа (10^{-4}). Механизм эффекта плазмид пока представляется гипотетическим.

В связи с этим нам показалось интересным исследовать влияние обнаруженной нами в клетках *Salmonella derby* лекарственно-устойчивой плазмиды рGK-101, с которой ассоциирована активность репарационного фермента ДНК-полимеразы типа I (5^{-6}) на радиорезистентность изогенных штаммов *S. derby*. Плазида рGK-101 *S. derby* придает клеткам устойчивость к хлорамфениколу (Cm), пенициллину (Pn) и стрептомицину (Sm).

Для генетической характеристики плазмиды рGK-101 в настоящей работе проведена ее элиминация, изучена активность ДНК-полимеразы I в полученных изогенных штаммах *S. derby*, исследована радиорезистентность дикого штамма *S. derby* К 89, его радиочувствительного бесплазмидного штамма К 82 pol⁻ и излеченных от плазмиды рGK-101 штаммов, образующих различные группы при действии УФ-света.

В работе использовали дикий тип *S. derby* К 89, выделенный нами его радиочувствительный мутант К 82 pol⁻. Характеристика штаммов: К 89—прототроф, Cm^r, Pn^r, Sm^r; *S. derby* К 82 pol⁻—ауксотроф, Tc^r. Применяли полноценные жидкие и минимальные среды с добавлением необходимых факторов роста. Использовали коммерческие препараты антибиотиков в следующих концентрациях (в мкг/мл): хлорамфеникол—20; стрептомицин—200, пенициллин—20, гидрохлорид тетрациклина—20, бромистый этидий—100.

Элиминацию плазмиды осуществляли обработкой клеток *S. derby* К 89 в количестве 10^2 клеток/мл бромистым этидием в концентрации 100 мкг/мл. Обработанные клетки инкубировали при 37° 18 ч, а затем высевали на чашки без антибиотиков. Выжившие клетки, которые составляли 3%, высевались на селективные чашки с антибиотиками для отбора излеченных от плазмиды клеток, число которых составляло 10%, а также на минимальную среду.

Активность ДНК-полимеразы определяли в стандартных условиях (⁷) 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, ГТР—12,3, СТР—44, H^3 ТТР—12, $MgCl_2$ —30, буфер рН—8—80. Радиоактивность считали в счетчике «Intertechnique» (Франция).

Облучение УФ-светом производили под лампой БУВ-30 на расстоянии 50 см (8). Облучали дозами $3,5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$ и $15 \cdot 10^{-5}$ дж/см². Культуру ($T=10^8$ кл/мл) перед облучением разводили 1:100 в физиологическом растворе.

Результаты экспериментов по излечению клеток *S. derby* К 89 от плазмиды представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика групп излеченных от плазмиды рGК—101 штаммов *S. derby* К89

Группа излеченных штаммов	Рост на полноценной среде с антибиотиками				Рост на минимальной среде	Активность ДНК-полимеразы I, импульсы за 1 мин
	Sm	Rp	Sm	Tc		
I	—	—	—	—	+	70
II	—	—	—	+	—	65
III	—	+	—	—	+	75
IV	—	+	+	—	+	70
V	—	+	—	+	+	75
К89 дикий штамм	+	+	+	—	+	5450
К82 радиочувствительный мутант	—	—	—	+	—	130

При элиминации плазмиды происходит расщепление признаков по устойчивости к антибиотикам и по способности роста на минимальной среде. По антибиотикоустойчивости излеченные клетки распадаются на несколько групп.

Первую группу составляют клетки, в которых плаزمида полностью элиминирована. Вторую составляют клетки, утратившие резистентность ко всем антибиотикам, свойственную К 89,—ауксотрофы, но приобретшие резистентность к тетрациклину (Тс), как и ранее выделенный из штамма *S. derby* К 89 радиочувствительный мутант К 82 pol^- . В третью группу входят клетки, устойчивые лишь к Rp. Четвертую составляют клетки, устойчивые к Sm и Rp. В последнюю группу входят клетки, резистентные к Rp и Тс.

Все излеченные клетки, входящие в указанные группы, кроме второй, делятся в свою очередь на прототрофные и ауксотрофные. Подобное расщепление признаков по способности роста на минимальной среде наблюдалось и при конъюгационном переносе плазмиды рGК-101 из дикого штамма *S. derby* К 89 в реципиентный штамм *S. derby* К 82 pol^- и при трансформации клеток *S. derby* К 82 pol^- плазмидной ДНК К 89.

При определении активности ДНК-полимеразы I у полученных элиминацией плазмид изогенных штаммов *S. derby* К 89 показано, что у всех излеченных штаммов независимо от группы элиминация плазмиды приводит к снижению уровня активности ДНК-полимеразы I до 1—3% (табл. 1). Подобная низкая активность ДНК-полимеразы I

была выявлена нами в мутантном бесплазмидном штамме *S. derby* К 82 pol⁻ (6).

Таким образом, полученные при элиминации плазмиды рGК-101 в *S. derby* К 89 различные группы по антибиотикоустойчивости и росту на минимальной среде подтверждают высказанное нами в предыдущем сообщении (6) предположение о диссоциации плазмиды на несколько мелких, несущих различные маркеры. Результаты, полученные по определению активности ДНК-полимеразы I, а именно ее низкая активность в данных штаммах, является еще одним доказательством ассоциации активности ДНК-полимеразы I с плазмидой рGК-101 *S. derby*.

Нужно отметить, что во всех изогенных штаммах *S. derby* К 89 отсутствует устойчивость к Cm. Это позволяет предположить, что ген, ответственный за синтез ДНК-полимеразы I, и ген, определяющий устойчивость к Cm, по-видимому, расположены рядом.

Результаты экспериментов по сравнительному изучению радиорезистентности дикого штамма *S. derby* К 89, его радиочувствительного бесплазмидного штамма К 82 pol⁻ и полученных излеченных штаммов различных групп при действии УФ-света представлены в табл. 2.

Таблица 2

Культура	Доза облучения, дж/см ²		
	3,5 · 10 ⁻⁵	7 · 10 ⁻⁵	15 · 10 ⁻⁵
К 89 дикий	18	6	0,08
К 82 pol ⁻ мутант	11,8	1,7	0,07
К 89 ₂₉ (II гр.)	18	1,3	0,08
К 89 ₁₁ (III гр.)	65	36	4,3
К 89 ₄₀ (V гр.)	36	8,9	0,21
К 89 ₆ (I гр.)	25	2,5	0,35
К 89 ₁₂ (I гр.)	28	11,3	1,8
К 89 ₂₆ (IV гр.)	38	22	2,3

Из таблицы видно, что у всех излеченных штаммов, отличающихся по устойчивости к антибиотикам и по способности роста на минимальной среде, при всех дозах облучения процент выживших клеток значительно выше, чем у дикого штамма, несущего плазмиду.

Повышение радиоустойчивости более четко наблюдается при больших дозах облучения (3,5 · 10⁻⁵ дж/см²). Наиболее устойчивым к действию УФ-лучей при всех дозах облучения является излеченный штамм К 89₁₁, устойчивый к Rp.

Представляет интерес также бесплазмидный излеченный штамм К 89₂₉, который по своим признакам (Tc^r, ауксотроф) похож на бесплазмидный мутант К 82 pol⁻ и проявляет при всех дозах облучения одинаковую с ним радиочувствительность, т. е. выживаемость его при всех дозах облучения ниже выживаемости дикого штамма К 89, в отличие от всех излеченных штаммов.

Проверялась также способность клеток излеченных штаммов поддерживать рост и размножение фага др8 *S. derby*. Все излечен-

ные штаммы, как и бесплазмидный мутант K 82 pol⁻, утратили эту способность.

Таким образом, изучение радиорезистентности изогенных штаммов K 89 показало, что в данных штаммах отсутствие плазмиды приводит к значительному повышению степени радиорезистентности клеток при имеющейся низкой активности ДНК-полимеразы I, что указывает, по-видимому, на наличие какой-то индуцибельной репарации, зависимой от УФ-света.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ո. Գ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ, Կ. Հ. ԴԱՆԱԳՈՒԼՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Փ. Ա. ԿՄՈՅԱՆ

S. derby K 89-ի ռադիոռեզիստենտ՝ ԴՆԹ-պոլիմերազա 1-ի դեֆեկտ կրող շտամները

Ներկա աշխատանքում ուսումնասիրվել են էթիդիում բրոմիդով պլազմիդազի էլիմինացիայի միջոցով ստացված տարբեր խմբերի (որոնք տարբերվում են անտիբիոտիկային զգայունությամբ և մինիմալ միջավայրի վրա աճման ընդունակությամբ) ռադիոռեզիստենտությունը ՄՓ-ի նկատմամբ և այդ խմբերում ԴՆԹ-պոլիմերազա 1-ի ակտիվությունը:

Ստացված արդյունքները հաստատում են մեր այն ենթադրությունը, որ S. derby-ի pGK-101 պլազմիդան դիսոցվում է երեք փոքր պլազմիդաների, որոնք կրում են տարբեր մարկերներ:

Ռադիոռեզիստենտության ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ իզոգեն շտամներում պլազմիդազի էլիմինացիան ԴՆԹ-պոլիմերազա 1-ի ակտիվության նվազման հետ բերում է ռադիոռեզիստենտության զգալի բարձրացման, որը վկայում է, ըստ երևույթին ՄՓ-լույսից կախված ինչ-որ ինդուցիբելային ռեպարացիայի գոյությունը:

ЛИТЕРАТУРА — ԴՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ S. Howarth. J. Gen. Microbiol., vol. 40, 43—55 (1965). ² K. E. Mortelmans, B. A. D. Stocker, J. Bacteriol., vol. 128: 271—282 (1976). ³ Скавронская и др. ДАН СССР, т. 236, 460—463 (1977). ⁴ G. C. Walker, J. Supramol. Struct. suppl., vol. 2, 70 (1978). ⁵ Ж. А. Кцоян, Н. Н. Саркисян, К. А. Аракелова, ДАН АрмССР, т. 68, № 5 (1979). ⁶ Н. Н. Саркисян, Р. Г. Антонян, Ж. А. Кцоян, ДАН АрмССР, т. 78, № 1 (1982). ⁷ M. Gefter, Progr. Nucl. Acid. Research., vol. 14, 101 (1974). ⁸ Дж. Муллер, Эксперименты в молекулярной генетике, Мир, М. 1976.