

УДК 579.252.55

БИОЛОГИЯ

Ж. А. Кцоян, Л. М. Ханбекян, К. А. Аракелова, Н. Н. Саркисян, В. Е. Карапетян

Явление транзиции R-фактора в клетках *S. derby*

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 26/V 1987)

Ранее нами сообщалось о диссоциации длинного конъюгативного R-фактора (100 т.п.н.) *S. derby*, придающего клеткам устойчивость к различным антибиотикам: хлорамфениколу, пенициллину, стрептомицину и сульфаниламидам, и образовании более мелких плазмидных ДНК, гетерогенных по длине—от 22 до 3,7 т.п.н. и менее (1).

Подобного рода явление отмечено в клетках *Proteus mirabilis* сложных R-факторов, NR 84, NR1, где показана амплификация г-детерминант, определяющих резистентность к хлорамфениколу, стрептомицину при выращивании клеток в присутствии высоких концентраций антибиотиков (2-3). Эта амплификация приводит к образованию R-факторов, состоящих из одного RTF-компонента и нескольких копий г-детерминант (4).

Целью настоящей работы было исследование явления амплификации г-детерминанты R-фактора и участие гес А системы клетки-хозяина в образовании плазмидных ДНК, возникающих в процессе диссоциации R-фактора *S. derby*.

В работе использовали диккий тип *S. derby* К 89, содержащий R-фактор, придающий клеткам устойчивость к ряду антибиотиков: пенициллину (Pn), стрептомицину (Sm), хлорамфениколу (Cm) и сульфаниламидам, а также штаммы *E. coli* KS 707 и KS 706 гес А, мутант по общей рекомбинации клетки-хозяина. Конъюгационные скрещивания проводили по методу Дэтта (5). Антибиотики в опытах по конъюгации использовали в следующих концентрациях (мкг/мл): Pn—20, Cm—20, Sm—200. Отбор эксконъюгантов проводили на селективной среде с антибиотиками и рифампицином (Rif) (маркер реципиентных клеток *E. coli*), а также на минимальной среде для отбора ауксотрофных эксконъюгантов.

Плазмидную ДНК выделяли методом получения осветленных лизатов (6) и проводили электрофоретический анализ этой ДНК в 0,8%-ном агарозном геле (7). Активность ДНК-полимеразы определяли в стандартных условиях (8) с использованием активированной ДНК из спермы лосося (в качестве затравки-матрицы).

Для выяснения участия гес А-системы клетки-хозяина в образовании гетерогенных по размерам мелких плазмид *S. derby*, выявляемых при электрофоретическом и электронно-микроскопическом анализе плазмидных ДНК клеток *S. derby* дикого типа и его производных.

эксонъюгантов и трансформантов, были проведены эксперименты по конъюгационному переносу R-фактора *S. derby* в клетки *E. coli* KS 707 и KS 706 гес А. При генетическом анализе полученных от скрещивания клонов (*S. derby* К 89 × *E. coli* KS 707 и *S. derby* К 89 × *E. coli* KS 706 гес А) обнаружены эксонъюганты двух классов—ауксотрофные и прототрофные, которые проявляют расщепление признаков антибиотикоустойчивости, подобно эксонъюгантам, полученным при скрещивании *S. derby* К 89 с бесплазмидным мутантом *S. derby* К 82 (9). Частота эксонъюгантов в обоих типах скрещиваний была равной ($T=2 \cdot 10^{-6}$). Электрофоретический анализ исследуемых эксонъюгантов выявил наличие всех плазмидных ДНК, независимо от их длины, определяемых в природном штамме *S. derby* К 89. Таким образом, процесс образования гетерогенных плазмидных ДНК *S. derby* при распаде сложного R-фактора на более мелкие плазмиды не зависит от гес А-системы клетки-хозяина.

Явление амплификации г-детерминант R-фактора *S. derby* исследовали при выращивании клеток *S. derby* в среде с высокой концентрацией антибиотика. Клетки *S. derby* К 89 помещали в среду, содержащую антибиотик хлорамфеникол в концентрации до 150 мкг/мл, поэтапно, в течение трех суток. Клетки, выросшие в среде, содержащей 150 мкг/мл Cm, и контрольные (выросшие в среде без антибиотика) высевали в чашки со средой, содержащей Cm в концентрации 120 мкг/мл, и со средой не содержащей лекарства. Результаты показывают, что клетки, прошедшие предварительную инкубацию в среде с антибиотиками, проявляют к Cm резистентность, в 150 раз большую, чем контрольные (таблица).

Резистентность к Cm клеток *S. derby*, выращенных в разных условиях

Штамм	Резистентность к Cm, %		ДНК-полимеразная активность, имп. за 60"
	Концентрация Cm, мкг/мл		
	120	150	
К 89 без а/б	0,4	0	10,725
К 89 транзицирование 120 мкг/мл	63,2	36,1	32,700

При инкубации клеток, уже подвергшихся транзиции в течение многих поколений в среде, не содержащей антибиотик Cm, имеет место снижение резистентности клеток к повышенным концентрациям антибиотика. Это явление названо «обратной транзицией». В наших экспериментах из девяти колоний, отобранных из транзицированной культуры *S. derby* К 89 и инкубированных в отсутствие антибиотика, семь проявили снижение резистентности к высокой концентрации Cm на 50 и более процентов. Явление амплификации г-детерминанты, определяющей устойчивость клеток *S. derby* к Cm, в клетках *E. coli* не обнаружено. При выращивании клеток *S. derby* К 89, несущих R-фактор, в среде, содержащей высокие концентрации Pn, повышение резистентности клеток *S. derby* к Pn не выявлено. Изначальная вы-

сокая резистентность клеток *S. derby* К 89 к *Sm* (8000 мкг/мл), детерминированная R-плазмидой и связанная с нарушением проницаемости мембран, не позволяла проводить эксперименты по проверке амплификации γ -детерминанты, определяющей *Sm*-устойчивость клетки.

Таким образом, анализ явления транзиции R-фактора *S. derby* указывает на возможную амплификацию лишь одного сегмента γ -детерминанты, определяющего устойчивость клеток к *Sm*, входящему в состав сложного R-фактора *S. derby*, распадающегося на мелкие плазмидные ДНК. Известно, что значительная часть гес А-независимых рекомбинантных событий у бактерий как структурно, так и функционально обеспечивают уникальные генетические элементы IS (⁴).

Авторы, определившие в клетках *Pr. mirabilis* процесс диссоциации R-фактора и образования множественных копий γ -детерминанты, предполагают участие IS-элементов в механизмах этих процессов (¹⁰). Механизм диссоциации и образования гетерогенных плазмидных ДНК с имплификацией одного из сегментов R-фактора γ -детерминанты, обеспечивающей устойчивость к *Sm* в клетках *S. derby*, является предметом дальнейших исследований.

Ранее нами выявлена плазмидная ДНК, обеспечивающая резистентность клеток к *Sm*, с которой ассоциирована ДНК-полимеразная активность, являющаяся продуктом диссоциации сложного R-фактора *S. derby* *pSD Sm pol* (¹). В связи с этим представилось интересным определение ДНК-полимеразной активности в клетках *S. derby*, выращенных при высоких концентрациях *Sm* (120 мкг/мл). Из таблицы видно, что в исследуемых клетках ДНК-полимеразная активность в 3 раза выше, чем в контрольных клетках штамма.

Возможно, что образование множественных копий γ -детерминанты, определяющих устойчивость к *Sm*, обеспечивает активацию гена плазмиды *pSD Sm pol*, ответственного за ДНК-полимеразную активность клеток *S. derby*.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ Լ. Մ. ԽԱՆՐԵԿՅԱՆ, Կ. Ա. ԱՌԱՔԵԼՈՎԱ, Ն. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ,
Վ. Ն. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

S. derby-ի բջիջներում R-գործոնի տրանզիցիայի երևույթը

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է R-գործոնի γ -դետերմինանտի ամպլիֆիկացիայի երևույթը և *S. derby*-ի բջիջներում *recA* համակարգի մասնակցությունը R-գործոնի գիսոցիացիայի հետևանքով պլազմիդային ԴՆԹ-ների առաջացմանը: Ցույց է տրված, որ այդ պլազմիդային հետերոզեն ԴՆԹ-ների առաջացումը կախված չէ *S. derby*-ի բջիջների *recA* համակարգից:

R-գործոնի տրանզիցիայի երևույթի ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ *S. derby*-ի բջիջներում հնարավոր է R-գործոնի γ -դետերմինանտի միայն մեկ սեգմենտի ամպլիֆիկացիան, որը ապահովում է բջիջների կա-

յունությունը S_m-ի նկատմամբ: Հնարավոր է նաև, որ r-դետերմինան-
տի բաղաձայնի կրկնօրինակների առաջացումը, որը պայմանավորում է բջիշ-
ների կայունությունը S_m-ի նկատմամբ, բերում է R-պլազմիդային ԳնԹ-
պոլիմերազայի ակտիվութունն ապահովող գենի ակտիվացմանը:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Н. Н. Саркисян, Р. Г. Антонян, М. П. Светлова и др., Биохимия, т. 50, вып. 4, (1985). ² H. Hashimoto, R. H. Rownd, J. Bacteriol, v. 123, № 1 (1975). ³ R. H. Rownd, N. Goto, E. R. Appelbaum e. a., Microbiol. Drug Resistance, 3--25, (1975). ⁴ Г. Б. Смирнов, Т. С. Ильина, Генетика, т. 12, № 4 (1977). ⁵ W. Datta, R. W. Hodges, E. I. Shaw e. a., J. Bacteriol, v. 108, p. 1244 (1971). ⁶ P. Guerri, D. J. Leblanc, S. J. Falkow, J. Bacteriol, v. 116, p. 1094—1066 (1973). ⁷ E. M. Southern, J. mol. Biol., v. 98, p. 503—507 (1974). ⁸ P. Setlow, Methods Enzymol, v. 29, p. 3—12 (1974). ⁹ Н. Н. Саркисян, Р. Г. Антонян, Ж. А. Кцоян, ДАН АрмССР т. 75, № 1 (1982). ¹⁰ П. Брода, Плазмиды, Мир, М., 1982.