



УДК 575.24.576.851

И. С. Карпова, О. В. Пидпала

## RecE-НЕЗАВИСИМАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ У *BACILLUS SUBTILIS*

*Продолжено изучение необычной транспозируемой мутации сенной палочки, нестабильность которой проявляется в сочетании крайне высокой ревертабельности по аланину с частым возникновением мутаций в нескольких новых позициях. Введение с помощью трансформации в геном исследуемого мутанта маркера *gcsE4* не привело к снижению его мутабельности. Очевидно, реализация нестабильности не зависит от системы общей рекомбинации.*

**Введение.** Предшествующими работами было показано, что добавление эукариотической ДНК (сельди) в компетентную культуру сенной палочки приводит к возникновению многочисленных мутаций. У ряда мутантов наблюдалась продленная генетическая нестабильность, частые (до 50 %) реверсии, а также транспозиции, стимулируемые повышенной температурой [1—3]. Необычные свойства мутантов напоминали примеры природной генетической нестабильности, вызываемой мобильными элементами генома [4—6]. Описаны случаи, когда генетическая нестабильность у бактерий была следствием дубликации определенного сегмента хромосомы и последовавших за этим рекомбинационных событий между двумя гомологичными участками ДНК [7, 8]. Вместе с тем перемещение мобильных генетических элементов происходит по механизмам, независимым от системы общей рекомбинации, основанной на взаимодействии гомологичных нуклеотидных последовательностей [9—12].

Главная особенность исследуемой нами нестабильной системы (изучено подробно на примере ревертабельной ауксотрофной мутации по лейцину *Leu5-3*) состоит в ее способности «эволюционировать» в сторону изменения и усложнения проявлений нестабильности [3, 13]. Это может свидетельствовать о внутренней реорганизации наследственного материала, в частности о возникновении дубликаций. С другой стороны, транспозитивность мутации *Leu5-3* косвенно указывает на присутствие транспозоноподобного элемента.

Для выяснения природы найденного явления нестабильности представлялось принципиальным решить вопрос о зависимости свойств данной системы генетической нестабильности от функционирования основного гена, ответственного за рекомбинационные процессы у сенной палочки — гена *recE* [14]. Продукт этого гена у сенной палочки является аналогом *RecA*-белка кишечной палочки [14].

Поскольку невозможна прямая селекция *rec*-мутации, проявляющейся по чувствительности к антибиотику митоцину С (*mit<sup>S</sup>*), в геном штамма *BD224* дополнительно ввели селектируемый маркер, обуславливающий устойчивость к нейтральному в отношении процессов рекомбинации антибиотику — рифампицину (*rif<sup>r</sup>*). С этой целью неразведенную взвесь клеток выселили на чашку с полноценной средой, содержащей градиент концентрации рифампицина, и отобрали несколько колоний, устойчивых к антибиотику (3 мкг/мл). Из рифампицинустой-

чивого варианта штамма BD224 выделили ДНК, трансформировали штамм П-1 по признаку устойчивости к рифампицину, трансформантов пересеяли параллельно на среду с рифампицином и такую же среду с добавлением митомицина С. Двойные трансформанты, получившие маркер *recE4*, не росли на среде с митомицином (0,05 мкг/мл) и были отобраны для дальнейшей работы. При изучении нестабильности использовали только клоны, стойко сохраняющие маркер *recE4* в серии последовательных пересевов.

**Материалы и методы.** Первичный нестабильный лейцинзависимый ауксотроф Leu5-3 (*lys<sup>-</sup> leu<sup>-</sup>*) получен нами из штамма Lys42 (*lys<sup>-</sup>*) (коллекция ЛИЯФ АН СССР) с помощью низкополимерной ДНК сельди («Fluka», Швейцария) [15]. Производный от него ауксотроф по аланину П-1 (*trp<sup>-</sup> ala<sup>-</sup>*) выделен в потомстве одного из нестабильных триптофанзависимых ауксотрофов, возникших в результате прогревания штамма Leu5-3 [2]. (Буквой П обозначен пигментный вариант штамма.)

Полноценной средой был агар Хоттингера. В отличие от общепринятого использовали полутвердую (1 % агара) минимальную среду, содержащую соли, Спицайзена [16], на которой колонии достигают видимых размеров через 24 ч инкубации при 37 °С.

Маркер *recE4* ввели в геном мутанта П-1 с помощью трансформации.

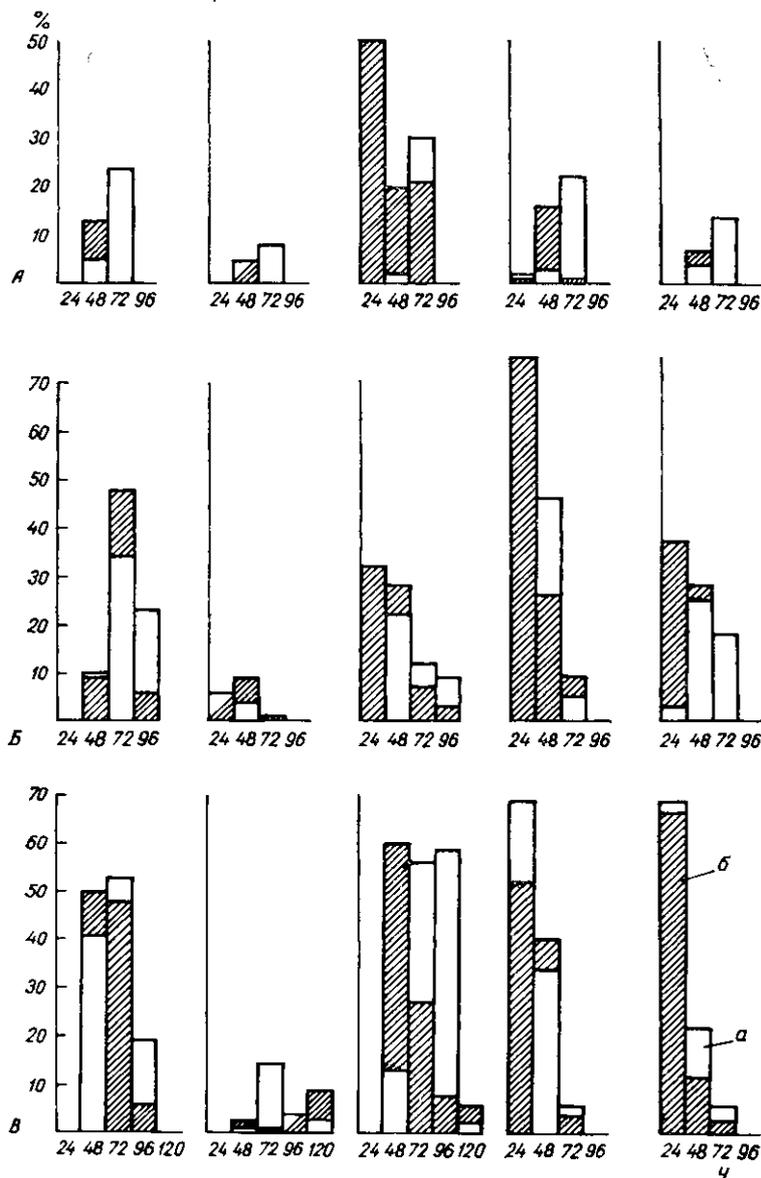
При изучении ревертабельности придерживались следующей схемы: колонию мутанта изолировали с полноценной среды, гомогенизировали в буфере и высевали в конечном разведении на минимальную среду без ауксотрофной добавки, с ауксотрофной добавкой и полноценную среду.

Колонии ревертантов учитывали через 24, 48, 72 и 96 ч. Уровень ревертабельности определяли как процентное отношение числа колоний, выросших на среде без соответствующей ауксотрофной добавки, к таковому на полноценной среде. Проявления нестабильности в условиях полноценной среды характеризовали с помощью клонального анализа. Вторично измененные клоны отбирали методом отпечатков на селективной среде. Для идентификации питательных потребностей ауксотрофов использовали 36 компонентов — азотистых оснований, аминокислот, водорастворимых витаминов.

**Результаты и обсуждение.** Сравнение ревертабельности родительского нестабильного мутанта Leu5-3 и его производных П-1 и П-1(*recE4*) выявило у них сходство проявлений нестабильности в селективных условиях (рисунок). На минимальной среде без ауксотрофной добавки формирование колоний ревертантов носит продленный характер. Большинство ревертантов возникает с задержкой на вторые и третьи сутки инкубации, причем их общее число может достигать значений, сравнимых с числом колоний на полноценной среде. Размеры колоний ревертантов у всех сравниваемых штаммов значительно варьировали — от едва заметных микроколоний до крупных, сравнимых с диким типом. Складывается впечатление, что ревертанты не предшествуют в культуре, а возникают на селективной среде в ходе остаточных клеточных делений. Сходно ведут себя мутанты и при внесении ауксотрофной добавки. В отличие от обычных ауксотрофов, где добавление требуемого вещества однозначно стимулирует рост, исследуемые штаммы обнаруживают гетерогенность. Часть колоний в присутствии добавки растет быстрее, чем на селективной среде; есть колонии, рост которых не зависит от добавления соответствующего вещества; от 5 до 40 % клеток не выживают на среде с ауксотрофной добавкой. Количественные характеристики нестабильности в селективных условиях у трех исследуемых штаммов значительно варьировали от клона к клоу.

Ранее мы отмечали, что на полноценной среде Хоттингера нестабильность штамма Leu5-3 не проявлялась. Средняя частота вновь возникающих ауксотрофов первоначально была несколько выше, чем у исходного штамма Lys42, составляя 0,01 — 2,80 % против 0,03 — 0,30 % [2]. В настоящее время после многолетнего хранения и пересевов час-

тота прямого мутирования штамма Leu5-3 снизилась до спонтанного уровня и не превышает 0,10 %. В отличие от этого штамм П-1 представляет собой пример одновременного сочетания двух разнонаправленных компонентов нестабильности — высокой ревертабельности и способности к частому прямому мутированию с образованием ауксотрофных и видимых мутантов, в том числе вариантов с различной степенью развития пигментации. Введение в геном штамма П-1 мутации *recE4* не привело к его стабилизации в условиях полноценной среды (таблица). Среди 1785 субклонов — потомков шести отдельных клонов



Ревертабельность родственных нестабильных штаммов до и после введения маркера *recE4*: А — нестабильный штамм Leu 5-3 (Leu<sup>-</sup>Δ); Б — производный от него штамм П-1 (Leu<sup>+</sup>Trp-Ala<sup>-</sup>Δ); В — штамм П-1 после введения маркера *recE4* (а — на селективной среде (СС); б — на СС с добавлением соответствующей аминокислоты (50 мкг/мл): лейцина (А), аланина (Б, В)). Цифры 1—5 обозначают номера клонов

Revertability of relative unstable strains before and after the *recE4* mutation introduction: А — unstable strain Leu 5-3 (Leu<sup>-</sup>Δ); Б — its derivative П-1 (Leu<sup>+</sup>Trp-Ala<sup>-</sup>Δ); В — strain П-1 after the *recE4* marker introduction; *f* — frequency of revertants, percentage of colonies on supplemented media; *t* — time of incubation, h; *a* — on minimal medium (MM); *b* — on MM supplement with leucine (А) or alanine (Б, В). Figures 1-5 designate clone numbers

штамма П-1(*recE4*) — мутанты составляют 5,2 %, что в 50 раз превышает спонтанный уровень и несколько выше (в 1,4 раза), чем в случае *rec+* штамма П-1. Из 17 идентифицированных ауксотрофов 1 нуждался в добавлении аргинина, 1 — гистидина, 2 — метионина, 1 — изолейцина, 3 — треонина, 1 — тирозина и 7 штаммов требовали для роста

*Частота прямых ауксотрофных мутаций в потомстве нестабильного штамма до и после введения маркера recE4*

*Frequency of forward auxotrophic mutants in progeny of unstable strain before and after the recE4 marker introduction*

Штамм							
П-1( <i>rec+</i> )				П-1( <i>recE4</i> )			
Клон	Исследовано субклонов	Число мутантов	Частота мутантов, %	Клон	Исследовано субклонов	Число мутантов	Частота мутантов, %
1	1368	170	12,4	1	345	21	6,1
2	103	1	1,0	2	287	1	0,4
3	621	5	0,8	3	1191	34	2,9
4	878	38	4,3	4	936	2	0,2
5	830	15	1,8	5	1687	51	3,0
6	3669	37	1,0	6	98	19	19,2
Средняя частота мутантов			3,6				5,2

одновременного добавления нескольких аминокислот группы глутаминовой кислоты (аргинина, пролина, аспарагиновой и глутаминовой кислот). Шесть вновь возникших ауксотрофов отличались крайне высокой ревертабельностью по новому маркеру, причем все они сохранили чувствительность к митомцину С и, следовательно, несли мутацию *recE4*.

Таким образом, введение в геном одного из крайне нестабильных мутантов сенной палочки мутации *recE4* не привело к снижению уровня его двунаправленной мутабельности как в отношении возникновения реверсий, так и в отношении прямого мутирования. Очевидно, реализация нестабильности не связана прямо с активностью гена *recE4*, продукт которого у сенной палочки аналогичен *RecA*-белку кишечной палочки и необходим для осуществления гомологичной рекомбинации.

Авторы приносят глубокую благодарность Г. В. Савченко за консультативную помощь и обсуждение работы.

#### Резюме

Продовжено вивчення незвичайної транспозованої мутації сінної палички, нестабільність якої виявляється в сполученні надзвичайно високої ревертабельності по аланіну з частим виникненням прямих мутацій в кількох нових позиціях. Введення за допомогою трансформації у геном досліджуваного мутанта маркера *recE* не привело до зниження його мутабельності. Очевидно, реалізація нестабільності не залежить від системи загальної рекомбінації.

#### Summary

The mutant of *Bac. subtilis* has stable requirement for tryptophan but is highly unstable in its requirement for alanine combined with frequently forward auxotrophic mutations. The introduction of *recE* marker by transformation has no effect on properties of the mutant under study.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гершензон С. М., Карпова И. С. Нестабильность и транспозиции мутаций, вызванных экзогенной ДНК у дрозофилы и сенной палочки // Тез. докл. 8-го двусторон. симпози. СССР — Франция (Москва, 9—12 июня, 1986).— М., 1986.— С. 10.

2. Карпова И. С., Пидпала О. В. Проявление нестабильности у лейцинзависимого ауксотрофа *Bacillus subtilis*, полученного с помощью ДНК сельди // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 40—46.
3. Пидпала О. В., Карпова И. С. Транспозиция нестабильной мутации сенной палочки, полученной с помощью чужеродной ДНК // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1989.— № 9.— С. 78—80.
4. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.— М.: Наука, 1984.— 472 с.
5. *Mobile genetic elements* / Ed. J. A. Shapiro.— New York: Acad. press, 1983.— 688 p.
6. Kleckner N. Transposable elements in prokaryotes // Ann. Rev. Genet.— 1981.— 15.— P. 341—404.
7. Murray G. E., Smith-Keary P. A recombination dependent replicating instability in *Salmonella typhimurium* // Mutat. Res.— 1976.— 36, N 2.— P. 283—290.
8. Trowsdale J., Anagnostopoulos C. Difference in the genetic structure of *Bacillus subtilis* strains carrying the *trpE*<sub>26</sub> mutation and strain 168 // J. Bacteriol.— 1976.— 126, N 2.— P. 609—618.
9. Site-specific recombination in transposition and plasmid stability / D. Sherratt, P. Dyson, M. Boocock et al. // Recombination at the DNA level // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1984.— 49.— P. 227—235.
10. Replicative and conservative transpositional recombination of the insertion sequences / T. A. Weinert, K. Derbyshire, F. M. Hughson et al. // Ibid.— P. 251—261.
11. Molecular mechanisms of general genetic recombination: The DNA-binding sites of the *RecA* protein / P. Howard-Flanders, S. C. West, J. R. Rusche et al. // Ibid.— P. 571—581.
12. Smith G. R. Homologous recombination in *E. coli*: multiple pathways for multiple reasons // Cell.— 1989.— 58, N 5.— P. 807—809.
13. Карпова И. С. Характер наследования состояния нестабильности у лейцинзависимого ауксотрофа *Bacillus subtilis*, индуцированного с помощью ДНК сельди // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1985.— № 3.— С. 69—72.
14. Барабанщиков Б. И. Механизмы репарации, рекомбинации и мутагенеза бактерий.— Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1984.— 117 с.
15. Карпова И. С. Получение мутаций у *Bacillus subtilis* с помощью чужеродной ДНК // Молекуляр. биология.— 1979.— Вып. 23.— С. 61—72.
16. Карпова И. С. Нестабильные мутанты *Bacillus subtilis*, индуцированные с помощью ДНК сельди // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1983.— № 6.— С. 66—70.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.09.90

УДК 577.152.34:579.852.11

Т. В. Сорочинская, С. И. Черных, В. А. Кордюм

## ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ФАГОЗАВИСИМОГО СИНТЕЗА β-ЛАКТАМАЗЫ TEM1 В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

На примере гена β-лактамазы разработана система амплификации гена. Исползованная система позволяет получить до  $6,0 \cdot 10^5$  единиц активности β-лактамазы в 1 мл культуральной жидкости и имеет то преимущество, что весь фермент находится в легкодоступной форме.

**Введение.** Развитие методов генной инженерии позволило практически любой ценный ген вводить в чужеродный организм. Для достижения высокоэффективной продукции клонированного гена используют несколько путей. Один из них — это увеличение числа копий гена в клетке, или амплификация гена. Для амплификации гена и соответственно получения увеличенного количества продукта, за синтез которого отвечает этот ген, используют, как правило, умеренные плазмиды или фаги.

Возможность амплификации генов на плаزمиде основана на том, что ряд плазмид имеет релаксированный контроль репликации, т. е. количество их в клетке может составлять от нескольких копий до нескольких тысяч [1]. Наибольшее распространение получили плазмиды

© Т. В. СОРОЧИНСКАЯ, С. И. ЧЕРНЫХ, В. А. КОРДЮМ, 1991

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1991. Т. 7. № 2.

2\*

19