

А. П. ПЕХОВ, О. Б. НАУМОВА

РЕВЕРТАНТЫ rec^+ ИЗ КУЛЬТУР
РЕКОМБИНАЦИОННОДЕФЕКТНОГО МУТАНТА
ESCHERICHIA COLI AB 2463 recA13

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 6 VIII 1973)

Генетическая рекомбинация у *E. coli* K-12 контролируется генами recA , recB и recC . В то время как мутации в гене recA приводят бактериальные клетки к полной утрате ими рекомбинационной способности (rec^-)*, а также к значительному повышению их чувствительности к ультрафиолетовому излучению и химическим мутагенам, мутации в генах recB и recC сопровождаются лишь частичной рекомбинационной дефектностью и только некоторым повышением чувствительности клеток к этим мутагенам (¹⁻³). Как показано в последние годы, из культур рекомбинационнодефектных бактериальных клеток, несущих мутантные гены recB^- и recC^- , возможно выделение ревертантов Rec^+ (^{4, 5}). В настоящем сообщении приводятся данные о выделении и свойствах ревертантов Rec^+ из культур рекомбинационнодефектных клеток, несущих мутантный ген recA^- .

Поиски ревертантов Rec^+ проводили в культурах штамма *E. coli* AB 2463F⁻Thr⁻Leu⁻Thi⁻Pro⁻His⁻Arg⁻Lac⁻Gal⁻Ara⁻Xyl⁻Mtl⁻T6^sS^r recA13 , происходящего от штамма *E. coli* AB 1157 rec^+ (⁶). Поскольку клетки recA^- одновременно чувствительны к митомицину C и метилметансульфонату, схема экспериментов заключалась в индукции мутантов, резистентных к этим мутагенам, и поисках среди них тех резистентных мутантов, которые восстанавливали способность формировать генетические рекомбинанты в скрещиваниях с клетками-донорами. Для индукции резистентных мутантов клетки бульонных культур исходного штамма обрабатывали в течение 60 мин. при 37° метилметансульфонатом (0,005 мол/мл) или N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (75 мкг/мл). Отмытые затем от мутагенов клетки взвешивали в МПБ и помещали на 18 час. в термостат при 37° для проявления мутантных фенотипов. Выросшие культуры разводили 1:10 в МПБ, и пробы по 0,1 мл из культур, обработанных метилметансульфонатом, высевали на МПА с митомицином C (0,5 мкг/мл), а из культур, обработанных нитрозогуанидином, — на МПА с метилметансульфонатом (0,005 мол/мл). Появляющиеся через 48 час. выращивания посевов при 37° изолированные колонии очищали пересевом на аналогичные среды, и после проверки генотипа высевали в МПБ для получения клоновых культур. Рекомбинационную способность выделенных резистентных мутантов (клоновых культур) характеризовали путем скрещивания их с клетками-донорами *E. coli* HfrHThi⁻S⁺ (порядок переноса: O—Thr—Leu—Pro—His—Arg...), а также путем введения в них полового фактора F'⁺-lac и испытания донорских свойств полученных меродиплоидов в скрещиваниях с *E. coli* W 1485 F⁻Met⁻T6^sS⁺. Все скрещивания проводили по стандартным

* В статье приняты следующие сокращения: rec — рекомбинация, Thr — треонин, Leu — лейцин, Thi — тиамин, Pro — пролин, His — гистидин, Arg — аргинин, Met — метионин, Xyl — ксилоза, Lac — лактоза, Gal — галактоза, Ara — арабиноза, Mtl — маннит, T6^s/T6^r — чувствительность/устойчивость к фагу T6, S⁺/S^r — чувствительность/устойчивость к стрептомицину.

методикам (⁷). В контрольных экспериментах использовали культуры исходного штамма АВ 2463гесА⁻, не подвергавшегося обработке мутагенами, а также культуры штамма АВ 1157гес⁺.

В проведенных экспериментах было выделено 234 мутанта *E. coli* АВ 2463, резистентных к митомизину С и метилметансульфонату. Как показали эксперименты по скрещиванию этих мутантов с клетками-донорами *E. coli* НfrН, большинство из них, вопреки ожиданию, по-прежнему характеризовалось рекомбинационной дефектностью, причем индекс их рекомбинационной дефектности был таким же, как и у клеток исходного штамма АВ 2463гесА⁻. Однако клетки одного мутанта, резистентного к

Таблица 1

Рекомбинационная способность мутантов *E. coli* АВ 2463, резистентных к митомизину С и метилметансульфонату (в скрещиваниях с *E. coli* НfrН)

Резистентные мутанты	Рекомбинанты и их частота (на одну донорскую клетку)			
	Thr ⁺ Leu ⁺ S ^r	Pro ⁺ S ^r	His ⁺ S ^r	Arg ⁺ S ^r
АВ 2463—4	1,0·10 ⁻²	0,8·10 ⁻²	0,4·10 ⁻²	0,2·10 ⁻²
АВ 2463—5	0,3·10 ⁻²	0,13·10 ⁻²	0,2·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁴
АВ 2463—7	0,2·10 ⁻²	0,1·10 ⁻²	0,1·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁴
АВ 2463—8	1,0·10 ⁻²	0,3·10 ⁻²	0,1·10 ⁻³	0,5·10 ⁻⁵
АВ 2463—9	2,5·10 ⁻²	0,7·10 ⁻²	0,1·10 ⁻³	0,4·10 ⁻⁵
АВ 2463—10	0,5·10 ⁻²	0,3·10 ⁻²	0,1·10 ⁻³	0,5·10 ⁻⁵
АВ 2463—11	5,1·10 ⁻²	1,1·10 ⁻²	0,9·10 ⁻³	0,4·10 ⁻⁴
АВ 2463—13	0,7·10 ⁻²	0,9·10 ⁻²	0,7·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—16	1,0·10 ⁻²	1,1·10 ⁻²	0,5·10 ⁻⁴	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—17	0,83·10 ⁻²	0,1·10 ⁻²	0,3·10 ⁻³	0,1·10 ⁻³
АВ 2463—18	3,0·10 ⁻²	0,4·10 ⁻²	0,1·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—19	2,0·10 ⁻²	0,5·10 ⁻²	0,25·10 ⁻³	0,9·10 ⁻⁴
АВ 2463—22	1,0·10 ⁻²	0,17·10 ⁻²	0,27·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—25	1,0·10 ⁻²	0,3·10 ⁻²	0,15·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—27	1,4·10 ⁻²	0,4·10 ⁻²	0,8·10 ⁻⁴	0,2·10 ⁻⁵
АВ 2463—29	1,9·10 ⁻²	0,7·10 ⁻²	0,2·10 ⁻³	0,2·10 ⁻⁵
АВ 2463—32	2,1·10 ⁻²	0,9·10 ⁻²	0,6·10 ⁻³	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—35	1,1·10 ⁻²	0,3·10 ⁻²	0,4·10 ⁻⁴	0,3·10 ⁻⁵
АВ 2463—36	0,75·10 ⁻²	0,45·10 ⁻²	0,27·10 ⁻³	0,2·10 ⁻⁵
АВ 2463—41	0,46·10 ⁻²	0,6·10 ⁻²	0,1·10 ⁻⁴	0,2·10 ⁻⁵
АВ 2463—42	1,4·10 ⁻²	0,85·10 ⁻²	0,2·10 ⁻⁴	0,2·10 ⁻⁵
АВ 2463 гесА13	0,8·10 ⁻³	0,2·10 ⁻³	0,1·10 ⁻⁵	0,1·10 ⁻⁶
АВ 1157 гес ⁺	1,1·10 ⁻²	0,58·10 ⁻²	0,2·10 ⁻⁴	0,2·10 ⁻⁵

митомизину С, и 20 мутантов, резистентных к метилметансульфонату, формировали генетические рекомбинанты различных классов с высокой частотой (табл. 1).

Как видно из табл. 1, мутант АВ 2463-4, который резистентен к митомизину С, формирует рекомбинанты Thr⁺Leu⁺S^r и Pro⁺S^r с частотой, намного превышающей частоту появления этих рекомбинантов при использовании в качестве реципиентов клеток исходного штамма АВ 2463гесА, и почти одинаковой частотой формирования рекомбинантов клетками штамма АВ 1157гес⁺, тогда как рекомбинанты His⁺S^r и Arg⁺S^r — с частотой, значительно большей не только в сравнении с клетками АВ 2463гесА, но и клетками АВ 1157гес⁺. Что касается остальных 20 мутантов, сведения о рекомбинационной способности которых приведены в табл. 1, то, будучи резистентными к метилметансульфонату, они формируют рекомбинанты всех классов с большей частотой, чем клетки штамма АВ 2463гесА, и сходной с клетками АВ 1157гес⁺.

Чтобы получить данные о характере кроссинговера при формировании резистентными мутантами рекомбинантов, из скрещиваний клеток-доноров НfrН с большинством резистентных мутантов отбирали по 50 рекомбинантов Pro⁺S^r и определяли частоту наследования ими неселективных прок-

симальных маркеров Thr^+ и Leu^+ . Как показали эксперименты, рекомбинанты Pro^+S^r в 67–97% случаев являются одновременно рекомбинантами Leu^+S^r и в 67–96% случаев — рекомбинантами Thr^+S^r . Поскольку в контрольных скрещиваниях рекомбинанты Pro^+S^r , сформированные клетками AB 1157 rec^+ , в 87% случаев также являются рекомбинантами Leu^+S^r и в 73% случаев — рекомбинантами Thr^+S^r , можно полагать, что частота наследования неселективных маркеров резистентными мутантами отражает нормальное сцепление между селективными и неселективными маркерами, т. е. нормальную частоту кроссинговера в формировании рекомбинантов резистентными мутантами.

Таблица 2

Генетический перенос от мутантов *E. coli* AB 2463, резистентных к митомицину С и метилметансульфонату

Резистентные мутанты	Частота переноса фактора F' -lac	Частота хромосомного переноса (частота рекомбинантов Met^+)
AB 2463—4	$4,3 \cdot 10^{-1}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—11	$4,0 \cdot 10^{-1}$	$0,42 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—13	$4,6 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—16	$3,8 \cdot 10^{-1}$	$0,37 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—17	$4,3 \cdot 10^{-1}$	$0,16 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—19	$3,4 \cdot 10^{-1}$	$0,2 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—22	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—25	$5,6 \cdot 10^{-1}$	$0,8 \cdot 10^{-3}$
AB 2463—27	$4,0 \cdot 10^{-1}$	$0,59 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—29	$4,0 \cdot 10^{-1}$	$0,18 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—32	$2,8 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—36	$4,3 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—41	$2,7 \cdot 10^{-1}$	$0,16 \cdot 10^{-2}$
AB 2463—42	$4,6 \cdot 10^{-1}$	$0,39 \cdot 10^{-2}$
AB 1157 rec^+	$4,6 \cdot 10^{-1}$	$0,17 \cdot 10^{-2}$
AB 2463 recA13	$3,1 \cdot 10^{-1}$	$< 0,5 \cdot 10^{-4}$

Известно, что хромосомный перенос, обусловленный половым фактором F' , зависит от рекомбинации между этим фактором и хромосомой бактерии-донора⁽⁸⁾. Поэтому дальнейшие эксперименты по характеристике рекомбинационной способности выделенных резистентных мутантов были связаны с введением в них от *E. coli* 200PS/ F' -lac фактора F' -lac и затем со способностью полученных меродиплоидов Lac^+S^r осуществлять генетический перенос (перенос фактора F' -lac и хромосомы). Для определения частоты переноса меродиплоидами Lac^+S^r фактора F' -lac их скрещивали с *E. coli* C-600 F' -Thr-Leu-Thi-Lac- S^r , селекционируя частичные диплоиды Lac^+S^r , а для определения частоты хромосомного переноса — с *E. coli* W 1485 F' -Met-T6 S^r , селекционируя рекомбинанты Met^+ . Чтобы исключить контрselection реципиентных маркеров Arg^+ и Thi^+ , которые из-за тесного сцепления с геном Met могли понизить частоту рекомбинантов Met^+ , селекцию последних проводили на среде с аргинином и тиамином. Результаты, которые были получены при изучении генетического переноса, осуществляемого 16 резистентными мутантами, используемыми в качестве доноров, приведены в табл. 2. Как видно из табл. 2, клетки-меродиплоиды, происходящие от резистентных мутантов AB 2463, осуществляют перенос фактора F' -lac и хромосомы с той же частотой или даже большей, что и клетки-меродиплоиды, несущие дикий аллель rec^+ , тогда как меродиплоиды, полученные путем введения полового фактора в клетки AB 2463 recA , передают только половой фактор, но не хромосому. Выборочное исследование генетической структуры рекомбинантов Met^+ , сформированных в скрещиваниях меродиплоидов AB 2463—11, AB 2463—22,

AB 2463—25, AB 2463—27 и AB 2463—29 с клетками-реципиентами W 1485, показало, что они чаще наследуют неселективный маркер Xyl⁻ и реже T6^r, что, исходя из направления переноса, осуществляемого данным типом фактора F'-lac (Pro—Met—Xyl—His—Try—T6^r...), также свидетельствует о нормальной частоте кроссинговера в формировании этих мутантов.

Результаты проведенных исследований показывают, что выделенные из культур E. coli AB 2463 *гесA* мутанты, резистентные к митомицину С и метилметансульфонату, являются ревертантами Rec⁺, поскольку по своей рекомбинационной способности они не отличаются от клеток, несущих аллель *гес*⁺. Эти ревертанты могут быть использованы для дальнейшего изучения контрольных механизмов генетической рекомбинации бактерий. Вместе с тем, наши данные об индукции резистентности клеток RecA⁻ к митомицину С и метилметансульфонату и одновременном восстановлении их рекомбинационной способности подтверждают предыдущие наблюдения, в соответствии с которыми рекомбинационный механизм восстанавливает повреждения ДНК, индуцируемые не только ультрафиолетовым излучением, но и митомицином С и метилметансульфонатом (⁹).

Университет дружбы народов
им. Патриса Лумумбы
Москва

Поступило
6 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. J. Clark, J. Cell. Physiol., 70, 2, p. 2, Suppl. 1, 165 (1967). ² P. Howard-Flanders, Ann. Rev. Biochem., 37, 175 (1968). ³ B. Low, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 60, 1, 160 (1968). ⁴ M. Oishi, ibid., 64, 4, 1292 (1969). ⁵ S. Barbour et al., ibid., 67, 1, 128 (1970). ⁶ P. Howard-Flanders, L. Theriot, Genetics, 53, 6, 1137 (1966). ⁷ R. Clowes, W. Hayes, Experiments in Microbiol. Genetics, Oxford, 1968. ⁸ J. Scaife, J. Gross, Genet. Res. (Camb.), 4, 328 (1963). ⁹ А. П. Пехов, С. А. Руднева, ДАН, 195, № 2, 469 (1970).