

М. И. МЕКШЕНКОВ, Т. М. СЕРЕГИНА

РЕДУПЛИКАЦИЯ, РЕКОМБИНАЦИЯ И ДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ В ЦИКЛЕ РАЗВИТИЯ ПОТОМСТВА ИЗ МЕРОЗИГОТ ФАГА Т4

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 15 II 1974)

При пониженной температуре специфическая фиксация корпускулы Т4 идет практически так же быстро, как и в нормальных условиях, но инъекция индивидуальной молекулы фага в клетку происходит достаточно медленно — перенос всего генома частицы в клетку при 7° занимает 21 мин. и идет со скоростью, равной 160 нуклеотидов в секунду (¹⁻³).

Процесс инъекции начинается и заканчивается практически синхронно по всей популяции инфицируемых клеток. Эти обстоятельства позволили разработать метод прерывания инъекции ДНК Т4 в клетку-хозяина, внешне сходный с методом прерывания конъюгации у бактерий. В результате прерывания инъекции каждая инфицируемая клетка бактериальной популяции получает один фрагмент хромосомы от отдельной частицы Т4. В предыдущих работах (^{4, 5}) клетки популяции бактерий *E. coli* В, получившие в условиях прерывания инъекции по одному фрагменту хромосомы от фага Т4 дикого типа, суперинфицировали в нормальных условиях (при 37°) целой хромосомой одного из одиночных или множественных амбер-мутантов Т4, которые из-за наличия амбер-мутации не способны самостоятельно размножаться в непермиссивном для них хозяине *E. coli* В. Было установлено, что совершенно определенная доля мерозигот Т4 из данной популяции репродуцирует зрелый вирус, при этом в каждом единичном выходе содержатся частицы обох родительских генотипов — дикий тип и амбер-мутант фага Т4. Оказалось, что в разных популяциях, отличающихся друг от друга размером фрагмента, количество репродуцирующих вирус мерозигот прямо пропорционально длине фрагмента и практически равно тому максимальному количеству частичных гетерозигот по данному гену, которое следует ожидать, исходя из модели популяции с циклическими перестановками генов. Такое 100-процентное спасение функции и спасение маркера позволяет предполагать, что фрагменты размером 0,19—0,9 от целой хромосомы, т. е. 0,19—0,9 фэ*, в составе мерозиготы автономно реплицируются, так что в накопившемся пуле обеспечивается высокая вероятность их рекомбинации с целыми хромосомами мутантного партнера. Поскольку для редупликации ДНК необходимы продукты «ранних» генов, то в отношении мерозигот, содержащих мутант амВ24(1), дефектный по репликации, вышесказанное предположение означает, что гены в составе малых фрагментов выражаются так же эффективно, как и в составе целой хромосомы (^{4, 5}). Оба приведенных выше предположения полностью подтверждаются результатами настоящей работы. В ней мы исследовали ряд новых типов популяций мерозигот фага Т4, различающихся между собой свойствами мутантных генов в гетерозиготах и условиями, влияющими на проявление их функций. Используемые в опытах среды, реактивы, метод получения и идентификации множественных амбер-мутантов, а также детали приводившей выше схемы конструирования мерозигот были описаны раньше (^{4, 5}).

* Один фэ (фаговый эквивалент) равен размеру целой хромосомы фага Т4.

По этой схеме получали популяции бактерий *E. coli* В или CR-63, в каждой из которых клетки содержали равный и контролируемый по величине фрагмент хромосомы от фага Т4Д дикого типа. Отдельные пробы из каждой полученной популяции затем суперинфицировали одним из 4 амбер-мутантов фага Т4Д: ам В22(43), ам А453(32), ам В22·F16(43, 32, 33) и ам А458·N134(50, 30). Таким образом, имелось 4 типа популяций мерозигот фага Т4 в перmissive условиях в клетках *E. coli* CR-63 и 4 аналогичных типа — в неpermissive условиях — в клетках *E. coli* В. В первой группе опытов у всех 8 полученных типов популяций определяли число титрующихся на газоне *E. coli* В, т. е. репродуцирующих

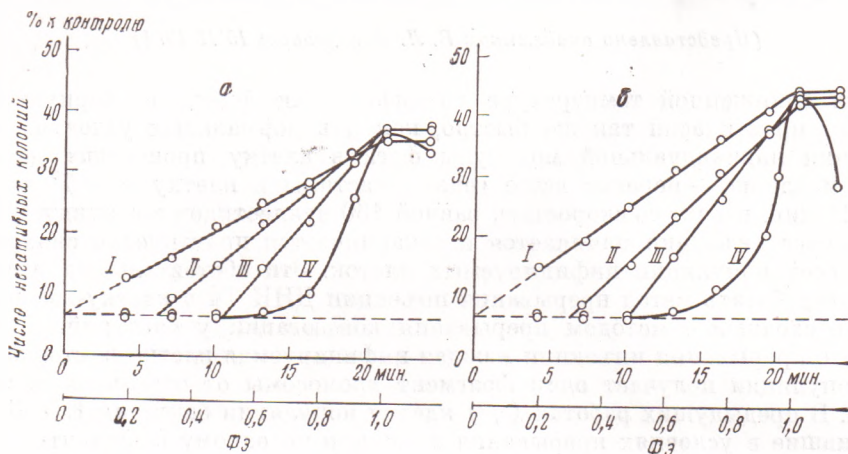


Рис. 1. Зависимость числа репродуцирующих фаг мерозигот фага Т4 от размера (в фэ и временном интервале) и генетической структуры диплоидной области. а — мерозиготы в перmissive хозяине (*E. coli* CR-63), б — в неpermissive хозяине (*E. coli* В). I—III — популяции бактерий, получившие наряду с фрагментом фага Т4Д дикого типа целую хромосому одного из следующих амбер-мутантов Т4Д: I — амВ22(43), амА453(32), амА458(50), амN134(33); II — амВ22·F16(43, 32, 33); III — амА458·N134(50, 33); IV — без суперинфекции

смешанное потомство мерозигот фага Т4, высевая их на твердый питательный агар сразу же после процедуры получения. Как известно (6), амбер-мутант по гену 43, структурному гену ДНК-полимеразы, характеризуется повышенной частотой рекомбинации, тогда как мутант по гену 32, наоборот, — пониженной частотой рекомбинации. Поэтому, если вопреки вышеприведенным выводам ам⁺-аллели не функционируют в составе малых фрагментов до тех пор, пока последние не рекомбинируют с хромосомой мутантного партнера, то следует ожидать, что количество мерозигот, репродуцирующих смешанное потомство, будет неодинаково в разных типах популяций. Эти различия могли бы проявлять зависимость от условий для процесса рекомбинации, т. е. природы дефекта у амбер-мутанта, размера диплоидной области мерозиготы — размера фрагмента от фага дикого типа, а также типа хозяина, в котором содержится исследуемый тип гетерозигот. На самом деле ни одного из ожидаемых различий в опытах не наблюдали. На рис. 1 количество репродуцирующего смешанного потомства мерозигот, соответственно в перmissive и неpermissive хозяине, представлено для разных типов популяций на кривых I, II и III как доля негативных колоний на *E. coli* В в зависимости от размера фрагмента, т. е. величины диплоидной области, приносимого в мерозиготу фагом дикого типа. Размер фрагмента или мерогеноты, выраженный в виде доли от целой хромосомы Т4, определяется, как это было установлено раньше (4), периодом времени, истекшим от начала контакта фага дикого типа с бактериями до момента обработки

суспензии в смесителе. Из сравнения кривых *I* на рис. 1а и б видно, что при одинаковом размере мерогеноты все типы популяций, независимо от природы и свойств дефектной функции мутантного партнера (одиночные мутанты am A453(32), am A458(50), am N134(33), am B22(43)), содержат одинаковое количество репродуцирующих смешанное потомство мерозигот как в пермиссивном, так и в непермиссивном хозяине. То же справедливо и в отношении популяций мерозигот, содержащих в качестве суперинфицирующего партнера амбер-мутант одновременно по нескольким генам (am B22·F16; am A458·N134) — кривые *II* и *III* на рис. 1а и б. При этом минимальный размер мерогеноты фага дикого типа, необходимый для образования репродуцирующих потомство мерозигот (равный, например, 0,3 фэ для мерозигот с am B22·F16, см. кривые *II* на рис. 1а и б), одинаков как в пермиссивном, так и в непермиссивном хозяине и

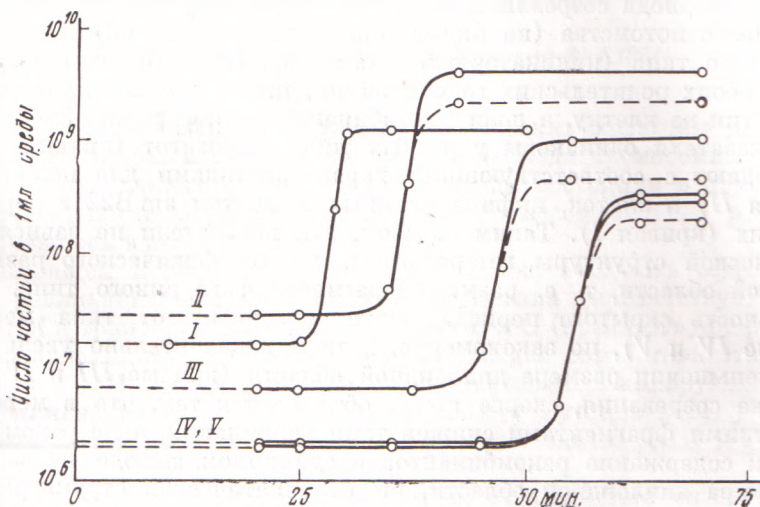


Рис. 2. Одиночный цикл развития фагового потомства в непермиссивном хозяине (*E. coli* B), содержащем различные генетические элементы фага T4D. *I* — *E. coli* B, инфицированные при 37° в питательном бульоне мутантом amB22(43); *II* — *E. coli* B, инфицированные при 7° в среде II (3) фагом T4D дикого типа и суперинфицированные при 37° в среде IIа мутантом amB22(43); *III* — *E. coli* B, получившие при 7° в среде II 0,62 фэ и *IV*, *V* — 0,19 фэ от T4 дикого типа и суперинфицированные при 37° в среде IIа мутантом amB22(43) (*III*, *IV*), и мутантом A453(32) (*V*). Сплошные линии — титр на *E. coli* CR-63, штриховые — титр на *E. coli* B

зависит только от расстояния между мутантными генами партнера, максимально удаленными друг от друга на генетической и физической карте фага T4D (7). Та же самая зависимость от расстояния между генами была установлена раньше (8) и в отношении других множественных амбер-мутантов.

Наблюдаемое 100-процентное спасение функции и спасение маркера можно было бы объяснить, не прибегая к положению об автономной репликации фрагментов, предшествующей процессу рекомбинации с партнером, если бы длительность скрытого периода созревания потомства в мерозиготах и содержание рекомбинантов дикого типа в нем обнаруживали четкую зависимость от типа исследуемой популяции мерозигот.

Результаты опытов по изучению обеих указанных характеристик, представленные на рис. 2, показали, что ни длительность вегетативного цикла развития, ни среднее соотношение генотипов в потомстве не зависят от типа, т. е. генетической структуры мерозигот. В этих опытах пробы из соответствующих популяций мерозигот в непермиссивном хозяине сразу

же после процедуры их получения разводили в 10^5 — 10^6 раз в свежем питательном бульоне и в продолжение последующей инкубации при 37° отбирали пробы, которые высевали на питательный агар с индикаторными бактериями штамма CR-63 — для определения суммарного количества частиц обоих родительских генотипов и штамма В — для определения количества частиц Т4 дикого типа. Начальное плато на кривых I, II, III, IV и V отражает титр репродуцирующих фаг меро- или полных зигот (в исходных пробах), в которых к данному моменту времени еще не содержится структурно зрелое потомство фага, так как они чувствительны к обработке хлороформом. Титры в этих пробах, определяемые на индикаторных штаммах CR-63 и В, одинаковы, что свидетельствует о наличии во всех единичных выходах частиц обоих родительских генотипов. Подъем на кривых I, II, III, IV и V (рис. 2) указывает на окончание скрытого периода созревания потомства, и последующее плато дает титр смешанного потомства (на индикаторном штамме CR-63) и рекомбинантов дикого типа (индикаторный штамм В). Средний единичный выход частиц обоих родительских генотипов по данным рис. 2 составляет 220—240 частиц на клетку, а доля рекомбинантов в нем равна 34—38%. Оба эти показателя одинаковы у разных типов мерозигот (кривые IV и V) и совпадают с соответствующими характеристиками для полной зиготы (кривая II) и клеток, инфицированных мутантом am B22 в нормальных условиях (кривая I). Таким образом, эти показатели не зависят ни от генетической структуры гетерозиготы, ни от физического размера диплоидной области, т. е. размера фрагмента фага дикого типа. Продолжительность скрытого периода также не зависит от типа мерозиготы (кривые IV и V), но закономерно, хотя и незначительно увеличивается при уменьшении размера диплоидной области (кривые III и IV). Такая задержка созревания, скорее всего, объясняется тем, что в мерозиготах с короткими фрагментами снижен темп репликации, а не рекомбинации, так как содержание рекомбинантов в единичном выходе не зависит ни от размера диплоидной области, ни от генетической структуры гетерозиготы.

Полученные данные позволяют заключить, что все исследованные am⁺-аллели в составе фрагментов функционируют так же эффективно, как и в составе целой хромосомы, компенсируя дефектные функции партнера в мерозиготах фага Т4. Фрагменты автономно реплицируются и затем рекомбинируют в накопившемся пуле с хромосомами партнера, обеспечивая такой же уровень смешанного потомства и рекомбинантов дикого типа в единичном выходе, как и в случае инфекции целой хромосомой.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. И. Мекшенков, Р. Д. Гусейнов, Матер. научн. симп., посвящен. биохимии и биофизике вирусных частиц и вирусных компонентов, 19—21 ноября 1969 г., М., 1969, стр. 15. ² М. И. Мекшенков, Р. Д. Гусейнов, ДАН, т. 191, № 2, 457 (1970).
³ М. И. Мекшенков, Р. Д. Гусейнов, Молекулярная биология, т. 5, в. 3, 444 (1971).
⁴ М. И. Мекшенков, Т. М. Серегина, ДАН, т. 213, № 5, 197 (1973). ⁵ М. И. Мекшенков, Т. М. Серегина, ДАН, т. 215, № 3 (1974). ⁶ H. Berger, A. J. Warren, K. E. Fry, J. Virol., v. 3, 171 (1969). ⁷ G. Mosig, Genetics, v. 59, 137 (1968).