

И. П. ВОРОБЬЕВА, И. А. ХМЕЛЬ, В. Ю. ГАВРИЛОВ

СОДЕРЖАНИЕ ДНК КОЛИЦИНОГЕННОГО ФАКТОРА E1 В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СКОРОСТЯХ РОСТА

(Представлено академиком А. А. Базвым 15 I 1974)

Колициногенный фактор E1 — бактериальная плазмида, определяющая синтез специфического белка колицина E1, который проявляет антибиотические свойства по отношению к группе кишечных бактерий. ДНК колициногенного фактора E1 имеет молекулярный вес $4,2 \times 10^6$ дальтонов и присутствует в клетке в логарифмической фазе роста в среднем в количестве 20—30 копий (¹, ²). Для колициногенного фактора E1 и некоторых факторов множественной лекарственной устойчивости показано, что при изменении условий культивирования количество копий плазмидной ДНК в клетке может изменяться (¹, ³⁻⁵).

В настоящей работе исследовалась зависимость количественного содержания ДНК колициногенного фактора E1 в клетках от времени генерации. Различные времена генерации бактериальных клеток достигались изменением состава среды и температуры культивирования.

Мы наблюдали, что при изменении состава среды содержание хромосомной и колициновой ДНК в клетке *E. coli* K12SE1 существенно менялось. Снижение температуры культивирования от 37 до 21° на содержание обоих типов ДНК практически не влияло.

В работе использовался штамм *E. coli* K12SE1. Состав сред приведен в табл. 1. Все источники углерода брались в концентрации 0,2%. Клетки выращивали при 37° с аэрацией. В опытах с различными температурами (37, 25 и 21°) использовалась среда M9 (⁶) с глюкозой. Включение H³-тимидина в клетки проводилось в течение времени генерации, характерного для каждой среды, в середине логарифмической фазы роста. На 10 мл культуры давали 100 мкС H³-тимидина (уд. акт. 2,8 С/г), 2 мг дезоксиаденозина и 50 мкг холодного тимидина. В начале и в конце включения отбирались пробы для счета клеток и определения суммарной ДНК; подсчет клеток проводился в камере Горяева, ДНК определяли с дифениламином по методу Бартонна (⁷). Процедура лизиса клеток проводилась по методу Хелинского (⁸), включающему получение сферопластов при обработке клеток лизоцимом и версеном и их последующее разрушение смесью детергентов Бридж 58 с дезоксихолатом натрия. Лизаты центрифугировали при 16 000 об/мин в течение 40 мин. В этих условиях 95% хромосомной ДНК переходит в осадок, а ДНК колициногенного фактора остается в надосадочной жидкости. Осветленные лизаты инкубировали с проназой при концентрации 1 мг/мл 20 мин. при 25°. Полученные лизаты фракционировали в градиенте концентраций сахарозы (5—20%), приготовленной на TES-буфере (⁸), при 39 000 об/мин, 6 час., 4°.

1. Количественные изменения ColE1ДНК в клетках при росте на различных средах. При выращивании клеток *E. coli* K12SE1 на различных средах (табл. 1) время генерации изменяется от 37 до 135 мин. С увеличением времени генерации размеры клеток уменьшались; количество хромосомной ДНК на клетку падало. Исходя из размера генома *E. coli*, равного $2,8 \times 10^9$ дальтонов (¹⁰), можно рассчитать коли-

чество геном-эквивалентов в клетках, выращенных на разных средах. Содержание ДНК меняется от 6 (обогащенная среда) до 2 (среда с пролином) геном-эквивалентов на клетку. При этом изменения размеров клеток четко коррелируют с изменением количества геном-эквивалентов на клетку.

Для определения количественных изменений ColE1ДНК в клетках *E. coli* K12SE1 мы измеряли включение H^3 -тимидина во фракцию ColE1ДНК за время генерации. Количество радиоактивной метки в этой фракции ДНК, полученное из профилей сахарозных градиентов (рис. 1), отнесенное к приросту клеток за время генерации, служило мерой количественного содержания ColE1ДНК в клетках *E. coli*. Исходя из значений приростов числа клеток за генерацию, веса хромосомной ДНК и числа импульсов за единицу времени во фракциях хромосомной и колициновой ДНК, можно рассчитать среднее содержание копий колициногенного фактора в клетке на разных средах (табл. 1).

Результаты экспериментов показывают, что при увеличении времени генерации на средах с глюкозой или пролином наблюдается значительное уменьшение содержания в клетке хромосомной и колициновой ДНК, однако относительное содержание этих двух типов ДНК меняется мало. Существенно иная картина наблюдается при переходе на среду, содержащую глицерин. В этом случае увеличение времени генерации сопровождается уменьшением хромосомной ДНК на клетку, но пропорционального уменьшения количества ColE1ДНК не происходит; в результате содержание плазмидной ДНК по отношению к суммарной ДНК клетки резко возрастает.

Анализ профилей сахарозных градиентов ДНК колициногенных клеток показал, что имеются существенные различия во фракциях ColE1ДНК при

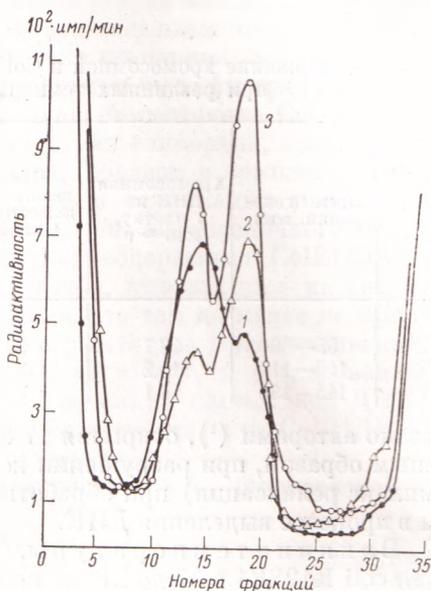


Рис. 1. Фракционирование в градиенте концентраций сахарозы осветленных лизатов клеток *E. coli* K12SE1, выращенных на разных средах. 1 — среды с глюкозой, 2 — M9+глицерин, 3 — M9+пролин

Таблица 1
Содержание хромосомной и ColE1ДНК в клетках *E. coli* K12SE1 при росте на средах различного состава

Среда	Время генерации, мин	Содержание хромосомной ДНК на 1 клетку. $\times 10^{-15}$ г	Число геном-эквивалентов на 1 клетку	Включение H^3 -тимидина в ColE1ДНК за время генерации имп/мин на 10^7 клеток	Число копий ColE1ДНК на 1 клетку	Число копий ColE1ДНК на геном-эквивалент
M9 + гидролизат казеина (0,5%), дрожжевой экстракт (0,3%) + глюкоза	37—40	28,4	6,0	138	50	8
M9 + глюкоза	55—60	13,7	3,0	65	29	10
M9 + глицерин	65—70	11,0	2,3	100	40	17
M9 + пролин	105—135	9,3	2,0	24	14	7

выращивании клеток на различных источниках углерода (рис. 1). При росте клеток на средах с глюкозой ColE1ДНК обнаруживается главным образом в форме суперскрученных молекул 23 S (до 80%), а при росте на средах с глицерином и пролином только 30% ДНК находится в форме суперскрученных молекул, а 70% в виде открытых колец 17 S. Такое же распределение открытых и суперскрученных форм ColE1ДНК было обнаружено (1) в клетках, выращенных на глюкозе и глицерине. Как было

Таблица 2

Содержание хромосомной и ColE1ДНК в клетках *E. coli* K12SE1 при различных температурах культивирования

Температура, °С	Время генерации, мин.	Хромосомная ДНК на 1 клетку, $\times 10^{-15}$ г	Число геном-эквивалентов на 1 клетку	Включение H^3 -тимидина в ColE1ДНК за время генерации, имп/мин на 10^7 клеток	Число копий ColE1ДНК на 1 клетку	Число копий ColE1ДНК на геном-эквивалент
37	55—60	13,7	3,0	65	29	10
25	110—115	15,2	3,2	61	32	9
21	145—155	16,1	3,4	65	32	8

показано авторами (1), открытая 17 S форма кольцевых молекул возникает главным образом, при разрушении комплекса колициновой ДНК с белком (комплекс релаксации) при обработке клеток депротеинизирующими агентами в процессе выделения ДНК.

2. Влияние температуры. Снижение температуры культивирования *E. coli* K12SE1 с 37 до 21° на среде M9 с глюкозой приводило к увеличению времени генерации втрое (табл. 2). В этих условиях количество хромосомной ДНК на клетку менялось мало. Количество H^3 -тимидина, включенного за время генерации во фракцию ColE1ДНК, в расчете на клетку также не менялось, что говорит о постоянстве содержания ColE1ДНК на клетку в диапазоне исследованных температур.

Приведенные данные показывают, что при изменении условий культивирования, влияющих на время генерации *E. coli* K12SE1, характер изменения количества хромосомной и ColE1ДНК на клетку сходен. С увеличением времени генерации при росте клеток на различных средах содержание ДНК колициногенного фактора падает, подобно содержанию хромосомной ДНК. Процентное отношение ColE1ДНК от суммарной ДНК на средах с глюкозой и пролином меняется мало при изменении времени генерации в три раза.

Обнаруженный нами характер количественных изменений хромосомной ДНК в клетке при изменении состава среды и температуры культивирования согласуется с имеющимися литературными данными (11, 12). Постоянство содержания ColE1 и хромосомной ДНК на клетку при снижении температуры от 37 до 21° свидетельствует о том, что суммарные скорости синтеза этих ДНК уменьшаются одинаково и пропорционально уменьшению скорости роста клеток. Полученные результаты, по-видимому, говорят о сходстве регуляции количественного содержания плазмидной и хромосомной ДНК в клетке. К такому же выводу пришли Гёбель и Хелинский (3) при сравнении количества ColE1ДНК в клетках, выращенных на глюкозе и ацетате, а также Тераваки и Раунд (5) в случае фактора множественной лекарственной устойчивости Rts1 при росте клеток на нескольких средах, дающих разное время генерации.

Однако имеются случаи, когда согласованность синтеза колициновой и хромосомной ДНК нарушается, что может свидетельствовать о различиях в регуляции количественного содержания этих двух типов ДНК в клетке. Например, показано, что при повышении температуры до 42—49° синтез

хромосомной ДНК тормозится в значительно большей степени, чем синтез ColE1ДНК⁽¹³⁾. Скоординированность количественных изменений плазмидной и хромосомной ДНК нарушается также при росте *E. coli* на средах с глицерином. В этом случае количество хромосомной ДНК на клетку согласуется с общей закономерностью изменения содержания ДНК в зависимости от времени генерации; однако содержание колициновой ДНК не изменяется пропорционально хромосомной ДНК, в результате чего количество копий ColE1ДНК в расчете на геном-эквивалент оказывается в 1,5—2 раза выше, чем на других средах. Такой же эффект глицерина по сравнению с глюкозой на богатых средах отмечен в⁽⁴⁾. Можно было бы предположить, что этот эффект связан с влиянием глицерина на состояние ColE1ДНК в клетке, так как было показано, что в присутствии глицерина, в отличие от сред с глюкозой, эта ДНК находится главным образом в комплексе с белком. Вопрос о возможном участии последнего в репликации плазмидной ДНК в настоящее время широко обсуждается, однако однозначного вывода пока не сделано⁽⁴⁾. В наших опытах высокое содержание ColE1ДНК в комплексе с белком (70—80%), помимо клеток, выращенных на среде с глицерином, наблюдалось также и на пролине, что тем не менее не приводило к увеличению количества ColE1ДНК в расчете на геном-эквивалент; напротив, оно даже несколько снижалось. По-видимому, в исследованных условиях для регуляции количественного содержания плазмидной ДНК в клетке не существенно, находится ли большая часть молекул ColE1ДНК в комплексе с белком или в виде свободных молекул.

Авторы выражают большую благодарность Э. Г. Могилевской и А. И. Новиковой за техническую помощь.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
2 I 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. B. Clewell, D. R. Helinski, *J. Bacteriol.*, v. 110, 1135 (1972). ² M. Bazaral, D. R. Helinski, *Biochemistry*, v. 9, 399 (1970). ³ W. Goebel, D. R. Helinski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 61, 1406 (1968). ⁴ H. Kasamatsu, R. Rownd, *J. Mol. Biol.*, v. 51, 473 (1970). ⁵ Y. Terawaki, R. Rownd, *J. Bacteriol.*, v. 109, 492 (1972). ⁶ S. Cohen, R. Arbogast, *J. Exp. Med.*, v. 91, 619 (1950). ⁷ K. Burton, *Biochem. J.*, v. 62, 210 (1956). ⁸ D. B. Clewell, D. Helinski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 62, 1159 (1969). ⁹ И. П. Воробьева, И. А. Хмель и др., *ДАН*, т. 211, 226 (1973). ¹⁰ J. Cairns, *Cold Spring Harbor Symp.*, v. 28, 43 (1963). ¹¹ M. Schaechter, O. Maalfe, N. O. Kjeldgaard, *J. Gen. Microbiol.*, v. 19, 592 (1958). ¹² K. G. Lark, *Bacteriol. Rev.*, v. 30, 3 (1966). ¹³ W. Goebel, Y. Kreft, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 49, 1699 (1973).