

В. В. АНДРОСОВ, В. С. ЛЕВАШЕВ

## ТОЧКА НАЧАЛА ДВУНАПРАВЛЕННОЙ РЕПЛИКАЦИИ ХРОМОСОМЫ F<sup>-</sup> ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* K12

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 9 VIII 1974)

В настоящее время установлено, что молекула ДНК бактерий, имеющая кольцевидную форму, реплицируется полуконсервативно в результате инициации вилки репликации (<sup>1-3</sup>). Полуконсервативная репликация является последовательным процессом, репликационная вилка иницируется один раз за цикл клеточного деления.

Существует предположение (<sup>4</sup>) о наличии у бактериальных штаммов специфической области инициации и направления синтеза хромосомы. В то же время из модели Nagata (<sup>5</sup>) следует, что начало репликации хромосомы у Hfr штаммов локализуется в области внедрения F фактора, вместе с тем у F<sup>-</sup> штаммов не существует определенной области для инициации синтеза ДНК. Исследования последних лет показали, что независимо от половой долильности, имеется специфическая область инициации репликации бактериальной хромосомы, располагающаяся между 55—78 мин. генетической карты *E. coli* K12 (<sup>6-7</sup>). Более точно, начало инициации репликации бактериальной хромосомы у штаммов *E. coli* B и K12 было картировано в экспериментах (<sup>8, 9</sup>), что позволяет считать строгую инициацию репликации ДНК в области гена *ilv* (74—76 мин. карты Taylor (<sup>10</sup>)).

Задачей настоящего исследования являлось изучение начала репликации хромосомы F<sup>-</sup> штаммов *E. coli* K12 методом частоты индуцированных мутаций.

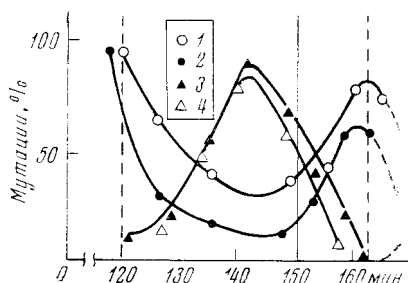
В экспериментах использовался супермутаген N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ). Ранее нами было показано, что НММ у штаммов *E. coli* способна с высокой частотой индуцировать транзиции и трансверзии в обоих направлениях (<sup>11</sup>). Из бактериальных штаммов использовались: *E. coli* K12 PA206, *gly*, *ser*, *thi*, *str*<sup>r</sup>; F<sup>-</sup> P673, *thr*, *leu*, *thi*, *lac*, *gal*, *mal*, *mtl*, *ara*, *xyl*, T1<sup>r</sup>, T5<sup>r</sup>, *str*<sup>r</sup>.

Для получения синхронизированных культур штаммы выращивались на среде Т (<sup>12</sup>). После выращивания в среде Т до логарифмической фазы роста, культуры осаждались на мембранных фильтрах (Nuts Synpro), промывались 0,9% NaCl и ресуспендировались в среде М-9 без глюкозы на 150—180 мин. при 37°. Затем, в среду добавлялась глюкоза (1%) и избыток аминокислот и тиамин в зависимости от аукотрофности штаммов. Наряду с этим методом, применялась техника синхронизации, основанная на истощении факторов роста (<sup>13</sup>). Время репликации бактериальной ДНК в условиях синхронного роста определяли по включению <sup>3</sup>H-тимидина (удельная активность 11,9 С/ммоль). Радиоактивность подсчитывалась на сцинтиляционном счетчике Intertechnique SL-30.

Мутагенез на растущих синхронно культурах под действием НММ, проводили по методу (<sup>14</sup>). Для этого пробы подвергали импульсному воздействию НММ в течение 5—10 мин. и клетки, быстро осажденные на мембранных фильтрах, промывали холодным фосфатным буфером (рН 9,0). Выделенные аукотрофные мутанты идентифицировали ауконографией. Картирование мутаций осуществлялось экспресс-тестом по (<sup>14</sup>), с большим набором Hfr и F<sup>-</sup> штаммов.

Наиболее эффективным методом синхронизации бактериальных популяций было истощение по факторам роста. Изучение времени репликации ДНК и кинетики клеточного деления в этих условиях показало, что первое клеточное деление наступает через 105—110 мин., а инициация синтеза ДНК наступает за 18—20 мин. до начала клеточного деления. После-

Рис. 1. Кинетика появления максимума мутантов во время второго репликационного цикла под действием НММ на синхронно растущем штамме РА206: *ilv* (1), *trp* (2), *tyrA* (3), *pro* (4). Время начала синтеза ДНК — вертикальная пунктирная линия; время клеточного удвоения — вертикальная сплошная линия. В экспериментах с штаммом Р678 получены приблизительно аналогичные результаты



дующие клеточные деления проходят быстрее, за 50—60 мин. В этих условиях синхронного роста клетки, как правило, проходят 4 цикла деления, после чего кривая роста переходит к экспоненте.

В первой серии экспериментов нами изучалось время, в течение которого будет наблюдаться наибольший выход мутантов по *ilv*, *trp*, *pro*, *tyrA*.

Выбор этих генетических маркеров был обусловлен тем, что по своей локализации на генетической карте они равномерно удалены друг от друга (<sup>14</sup>). В этих экспериментах максимум мутантов по *ilv* появлялся в самом начале репликационного цикла бактериальной хромосомы (рис. 1), максимум мутантов по *trp* — в конце репликационного цикла, а наибольший выход мутантов по *pro* и *tyrA* наблюдался одновременно в середине репликационного цикла бактериальной хромосомы.

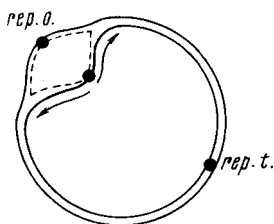


Рис. 2. Модель двунаправленной репликации бактериальной хромосомы в среде М-9 с глюкозой и аминокислотами. *rep.o* — область начала репликации; *rep.t* — терминация репликации

Эти результаты свидетельствовали о том, что начало репликации бактериальной хромосомы в условиях данного метода синхронизации осуществлялось в области гена *ilv*, а терминация репликации проходила в области гена *trp*. Одновременное появление максимума мутантов по *pro* и *tyrA*, расположенных в противоположных участках генетической карты *E. coli* K12, свидетельствовало о том, что репликационная вилка движется в двух

взаимнопротивоположных направлениях симметрично (рис. 2).

Во второй серии экспериментов для подтверждения полученных результатов исследовалось появление максимума мутантов по генам *lin A*, *chl A*, а у штамма РА206 дополнительно по *thr* и *leu*. Зная расположение данных генов на генетической карте и начало репликационного цикла из предыдущих экспериментов, можно теоретически рассчитать время появления максимума мутантов по тому или иному гену. Теоретические расчеты удовлетворительно совпали с экспериментальными данными (рис. 3). На основании регрессионного анализа рассчитано, что начало репликации бактериальной хромосомы у штаммов РА206 и Р678 картируется на  $73 \pm 3$  минуте генетической карты *E. coli* K12, а терминация репликации на  $28 \pm 3$  мин.

Таким образом, на основании полученных результатов следует заключить, что супермутagen НММ способна индуцировать мутации более эффективно в процессе репликации бактериальной хромосомы. Это свойство НММ может быть использовано на синхронных бактериальных культурах

для построения репликационных карт. Ранее такая возможность была доказана для нитрозогуанидина (<sup>7, 9</sup>).

Анализ репликации бактериальной хромосомы в синхронных культурах, изученный нами по частоте индуцированных НММ мутаций, показал, что репликация хромосомы F<sup>-</sup> штаммов *E. coli* K12 является двуправленным процессом и начинается, по-видимому, в строго определенной точке, картированной на  $73 \pm 3$  мин. генетической карты. Эти результаты

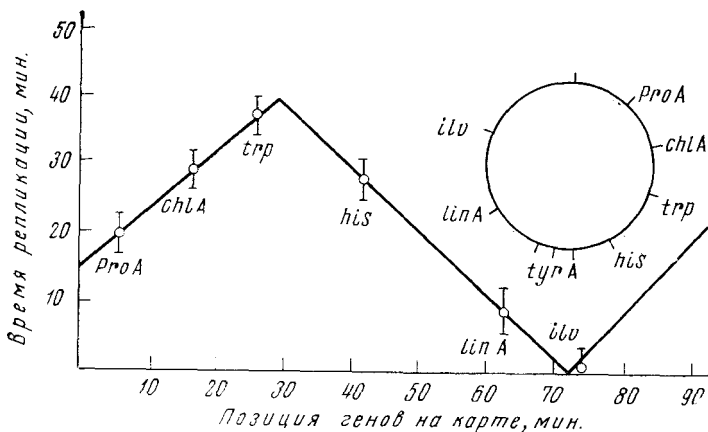


Рис. 3. Время репликации хромосомы штамма RA206 как функция позиции генов на генетической карте Taylor, рассчитанной регрессионным анализом. Аналогичное построение репликационной модели было характерно и для штамма P678.

хорошо согласуются с предположением, что инициация репликации бактериальной хромосомы штаммов *E. coli* начинается с гена *dnaA*, ответственного за синтез инициатора репликации (<sup>4, 15</sup>), располагающегося на 73 минуте генетической карты. Терминация репликации хромосомы также полярна и заканчивается симметрично инициации на  $28 \pm 3$  мин. генетической карты. Полученные нами результаты несколько отличаются от данных (<sup>9</sup>), где установлена по частотам реверсий, индуцированных нитрозогуанидином, точка начала репликации на  $75 \pm 4$  мин. генетической карты, и удовлетворительно совпадают с данными (<sup>8</sup>), где начало репликации бактериальной хромосомы отмечается на  $74 \pm 3$  мин. генетической карты.

Второй московский государственный медицинский институт  
им. Н. И. Пирогова

Поступило  
17 V 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Cairns, *J. Mol. Biol.*, v. 6, 208 (1963). <sup>2</sup> K. G. Lark, T. Repco, E. J. Hoffman, *Biochim. et biophys. acta*, v. 9, 76 (1963). <sup>3</sup> S. Cooper, C. E. Helmstetter, *J. Mol. Biol.*, v. 31, 519 (1967). <sup>4</sup> F. Jacob, S. Brenner, F. Cuzin, Cold. Spring, Harbor, Symp., v. 228, 534 (1963). <sup>5</sup> T. Nagata, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* v. 62, 884 (1969). <sup>6</sup> M. Masters, P. Broda, *Nature New Biol.*, v. 232, 137 (1971). <sup>7</sup> E. Cerda — Olmedo, P. C. Hanawalt, N. Guerola, *J. Mol. Biol.*, v. 33, 705 (1968). <sup>8</sup> R. E. Bird et al., *J. Mol. Biol.*, v. 79, 549 (1972). <sup>9</sup> R. Hohlfeld, W. Vielmetter, *Nature New Biol.*, v. 242, 139 (1973). <sup>10</sup> A. L. Taylor, *Bacteriol. Rev.*, v. 37, 155 (1970). <sup>11</sup> В. В. Андреев, ДАН, т. 215, 148 (1974). <sup>12</sup> F. E. Young, P. Haywood, M. Pollock, *J. Bacteriol.*, v. 102, 867 (1970). <sup>13</sup> T. S. Mathey, J. A. Suii, *J. Bacteriol.*, v. 92, 960 (1966). <sup>14</sup> B. Low, *J. Bacteriol.*, v. 113, 798 (1973). <sup>15</sup> J. A. Wechsler, J. D. Gross, *Mol. Gen. Genetics*, v. 113, 273 (1973).