

Г. Ф. ГАУЗЕ, А. В. ЛАЙКО, М. В. БИБИКОВА, Л. И. КУЗОВКОВА,
Т. И. СЕЛЕЗНЕВА, Ю. В. ДУДНИК

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРА ПРИ ИНДУКЦИИ МУТАНТОВ С ИЗМЕНЕННЫМ СОСТАВОМ ДНК У BACTERIUM PARACOLI

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 4 III 1970)

При изучении мутантов бактерий с измененным составом ДНК необходимо располагать данными о прямой генетической связи мутантов с исходными родительскими клетками. Изучение гибридизации ДНК показало, что ДНК, выделенная из таких мутантов, практически не гибридизируется с ДНК исходной родительской культуры (¹, ²). Если отсутствие гибридизации является характерной особенностью макромутантов и отличает их от обычных микромутантов бактерий, то генетическая связь макромутантов с исходной родительской культурой должна быть показана при помощи других методов.

В настоящей работе используется маркер устойчивости к циклосерину для доказательства генетической связи мутантов с измененным составом ДНК и исходных родительских клеток.

Работа была проведена с культурой *Bacterium paracoli* 5099, у которой восстановление повреждений ДНК, вызванных у.-ф. радиацией, нечувствительно к действию триафлавина. У этой культуры в 1966 г. (³) под действием у.-ф. радиации был индуцирован мутант с измененным составом ДНК (мутант 170 и близкие мутанты, содержащие 42,7% ГЦ-пар; исходные клетки содержат 48,0% ГЦ-пар). Некоторые штаммы этих мутантов обладают способностью к образованию цепочек клеток, и для всех штаммов характерно повышение чувствительности к различным антибиотикам. Индукция таких мутантов у *B. paracoli* 5099 закономерно воспроизводилась во многих опытах в течение последних трех лет. Фенотипически сходные мутанты у *Escherichia coli* были получены также в Швеции (⁴) и Японии (⁵). Эти мутанты обладают дефектом клеточной стенки, и многие из них образуют нити или длинные цепочки клеток. Предполагается, что повышенная чувствительность этих мутантов к различным антибиотикам связана с выпадением или изменением некоторых компонентов цитоплазматической мембраны, которые обычно препятствуют проникновению антибиотиков в клетку.

Полученные нитчатые мутанты с измененным составом ДНК весьма чувствительны ко многим антибиотикам, обладающим различными механизмами действия, за исключением циклосерина, в одинаковой степени подавляющего как исходную культуру, так и мутантов. Это, несомненно, связано со своеобразным механизмом действия *d*-циклосерина, который подавляет в бактериальной клетке аланин-рацемазу и *D*-ала-*D*-аласинтетазу (⁶). Поскольку у мутантов с измененным составом ДНК чувствительность к *d*-циклосерину не меняется, то можно предположить, что метаболические системы клетки, поражаемые *d*-циклосерином, не меняются при макромутировании. Поэтому данный антибиотик целесообразно использовать для получения маркера устойчивости к циклосерину у родительской культуры.

Индукция мутантов путем воздействия у.-ф. радиации проводилась по описанной ранее методике (⁷). Единственное существенное отличие заключалось в составе питательного агара, используемого для посева проб облу-

ченной суспензии бактерий. Поскольку мутанты с измененным составом ДНК не образуют кислоты на глюкозе и весьма чувствительны к действию кислот, образуемых колониями родительской культуры, то применялся глицерин вместо глюкозы. Питательный агар содержал 1% глицерина, 3% бульона Хоттингера, 0,5% пептона, 0,5% хлористого натрия. Глицериновый агар дал значительно лучшие результаты, чем агар с глюкозой. Чашки Петри с питательным агаром инкубировались при 37° в течение 72 час., и затем изолировались мелкие прозрачные круглые колонии. Некоторые из этих колоний были мелкими лишь фенотипически, и при последующем пересеве на питательный агар превращались в крупные, идентичные с коло-

Таблица 1

Нитчатые мутанты с измененным составом ДНК, индуцированные у *V. paracoli* 5099

Штамм	Т. пл. ДНК, °С	Содерж. ГЦ-пар, %	Время облуч., сек. *
<i>V. paracoli</i> 5099	89,0	48,0	
Мутант 170	86,8	42,7	105
Мутант 216	87,4	44,1	120
Мутант 938	87,2	43,7	105

* Время облучения исходной культуры, при котором индуцирован данный мутант.

Таблица 2

Влияние добавления глюкозы (0,5%) на дыхание исходной культуры *V. paracoli* 5099 и ее нитчатых мутантов

Штамм	QO ₂		ΔQO ₂ с глюкозой	ΔQO ₂ после нагрева *
	эндоген.	экзоген.		
<i>V. paracoli</i> 5099	34,4	162,2	4,7	—2
Мутант 170	28,7	28,1	1,0	—45
Мутант 216	26,9	26,7	1,0	—48
Мутант 938	29,0	29,5	1,0	—50

* Снижение QO₂ после гипертермии показывает действие нагревания при 47° в течение 20 мин. на последующее потребление кислорода при 37° в 0,5% глюкозе.

ниями родительской культуры. Такие колонии отбрасывались. Генотипически мелкие колонии испытывались на чувствительность к триафлавину (4). Повышение чувствительности к триафлавину (приблизительно в 200 раз) хорошо коррелирует с изменением нуклеотидного состава ДНК у *V. paracoli* 5099. Частота индукции нитчатых мутантов под действием у.-ф. радиации зависела от дозы облучения и имела четко выраженный максимум при экспозиции, равной 860 эрг/мм². В ходе опытов нами было изолировано 50 мутантов нитчатого типа с измененным составом ДНК.

Маркер устойчивости к циклосерину был получен путем культивирования исходной культуры *V. paracoli* 5099 на градиентных пластинках с питательным агаром, содержащим возрастающие концентрации *d*-циклосерина. Скорость роста циклосерин-устойчивого штамма практически не изменилась.

Были исследованы три типичных мутанта нитчатого типа (170; 216; 938), индуцированных у.-ф. облучением в исходной культуре *V. paracoli* 5099. Табл. 1 показывает, что содержание ГЦ-пар в ДНК этих мутантов составляет 42,7—44,1%, в то время как у исходной культуры оно равно 48%. Характерной особенностью нитчатых мутантов с измененным составом ДНК является потеря биохимической «гибкости» и повышенная чувствительность к температуре. Эти особенности метаболизма мутантов показаны на табл. 2. Дыхательные коэффициенты мутантов полностью рефрактерны к стимулирующему действию глюкозы, в то время как у исходных родительских клеток в аналогичных условиях дыхательные коэффициенты повышаются в 4,7 раза. Наблюдается также повышенная температурная чувствительность нитчатых мутантов, которая проявляется в том, что дыхание мутантов более уязвимо к влиянию гипертермии при 47° в течение 20 мин. на последующее потребление кислорода при 37°.

В табл. 3 приведены данные о чувствительности нитчатых мутантов к антибиотикам с различными механизмами действия. Резко повышена чув-

ствительность к антибиотикам, подавляющим синтез белка (например, к тетрациклину в 100 раз), синтез клеточной стенки (например, к пенициллину более чем в 10 000 раз), и синтез нуклеиновых кислот (например, к актиномицину *D* в 600 раз). Поскольку чувствительность нитчатых мутантов к антибиотикам, обычно не проникающим через клеточную стенку грам-отрицательных бактерий (пенициллин, эритромицин, акриномицин *D*), приближается к чувствительности голых протопластов этих бактерий, то можно предположить, что уязвимость мутантов связана с нарушением

проницаемости их клеточной оболочки. Сходные выводы были сделаны при изучении других штаммов фенотипически сходных нитчатых мутантов у *E. coli* (⁴, ⁵).

Весьма интересно, что нитчатые мутанты и исходная культура обладают одинаковой чувствительностью к *d*-цикloserину. Эту закономерность также отметили Нормарк (⁴) и Матсухаши (⁵) при работе с другими штаммами фенотипически сходных нитчатых мутантов *Escherichia coli*. Градиентные агаровые пластинки, содержащие возрастающие concentra-

Таблица 3
Минимальные подавляющие рост концентрации различных антибиотиков для исходной культуры *B. paracoli* 5099 и ее нитчатых мутантов (μг на 1 мл питательного бульона)

Ингибитор	<i>B. paracoli</i> 5099	Мутант 170	Мутант 216	Мутант 338
Тетрациклин	25	0,25	0,25	0,50
Стрептомицин	5	0,25	0,50	0,50
Эритромицин	250	0,06	0,025	0,25
Хлорамфеникол	12,5	2,50	2,50	2,50
Линкомицин	5000	0,62	1,25	0,62
Пуромидин	200	10	10	10
Пенициллин	630	0,03	0,03	0,03
Ристомицин	4000	0,63	0,63	0,63
Ванкомицин	1000	0,12	0,12	0,12
Митомицин С	10	0,12	0,12	0,12
Стрептогигрин	6,3	0,25	0,25	0,25
Актиномицин D	125	0,20	0,20	0,20
Дауномицин	4000	0,31	1,25	2,50
Оливомицин	>4000	0,16	0,08	0,16
<i>d</i> -Цикloserин	30	30	30	30

ции цикloserина, особенно удобны для изучения чувствительности к этому антибиотику различных штаммов *B. paracoli*. Исходная культура *B. paracoli* 5099 подавляется *d*-цикloserином на градиентной агаровой пластинке при концентрации 30 μг/мл. В исходной культуре постоянно появляются мутанты с повышенной устойчивостью к цикloserину. Путем

Таблица 4

Нитчатые мутанты с измененным составом ДНК и маркером устойчивости к цикloserину, индуцированные у *B. paracoli* 5099 CR

Штамм	Устойчивость, μг/мл	Т. пл. ДНК, °C	Содерж. ГЦ-пар, %
<i>B. paracoli</i> 5099	30	89,0	48,0
<i>B. paracoli</i> 5099	120	89,0	48,0
Мутант 1906	110	85,1	38,5
Мутант 1931	100	85,1	38,5
Мутант 1942	100	85,0	38,3

Таблица 5

Влияние добавления глюкозы (0,5%) на дыхание исходной культуры *B. paracoli* 5099 CR (устойчивой к цикloserину), и ее нитчатых мутантов

Штамм	Q _{O₂}		ΔQ _{O₂} с глюкозой
	эндоген.	экзоген.	
<i>B. paracoli</i> 5099 CR	23,7	107,4	4,5
Мутант 1906	10,4	44,6	1,1
Мутант 1931	25,2	38,6	1,5
Мутант 1942	9,7	9,0	1,0

систематического отбора таких мутантов при многократных пересевах на градиентные агаровые пластинки, содержащие цикloserин, которые продолжались в течение нескольких недель, был получен цикloserин-устойчивый вариант исходной культуры: *B. paracoli* 5099 CR. Резистентность к цикloserину у этой культуры была повышена в четыре раза: от 30 μг/мл у *B. paracoli* 5099 до 120 μг/мл у *B. paracoli* 5099 CR. Цикloserин-рези-

стенная культура была стабильной, и маркер устойчивости сохранялся при многочисленных пересевах на питательном агаре без циклосерина в течение многих месяцев.

Циклосерин-устойчивая исходная культура *V. paracoli* 5099 CR была использована для индукции мутантов с измененным нуклеотидным составом ДНК путем облучения у.-ф. радиацией. В этих опытах было изолировано 30 нитчатых мутантов и было установлено, что эти мутанты унаследовали маркер устойчивости к циклосерину. Соответствующие данные для трех типичных мутантов (1906; 1931; 1942) приведены в табл. 4, которая показывает также, что состав ДНК у мутантов изменен и содержание ГЦ-пар составляет около 38%. Дыхание нитчатых мутантов, сохранивших маркер устойчивости к циклосерину, рефрактерно к стимулирующему действию глюкозы (табл. 5). Необходимо отметить, что мутанты с измененным составом ДНК, приведенные в табл. 1 и 4, так же как и исходный штамм *V. paracoli* 5099, обладают общими антигенами, которые были обнаружены при использовании метода гелпреципитации в агаре по Охтерлони. Вместе с тем весьма интересно, что ДНК, выделенная из нитчатых мутантов 170 и 938, не гибридизируется с ДНК родительской культуры *V. paracoli* 5099.

Можно заключить, что наследование маркера устойчивости к циклосерину у нитчатых мутантов с измененным нуклеотидным составом ДНК является доказательством их генетической связи с исходной родительской культурой *V. paracoli* 5099. Необходимо отметить, что в последнее время была описана новая система макромутантов с измененным составом ДНК у *Pseudomonas testosteroni* (8).

Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
26 II 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Г. Гаузе, Ю. В. Дудник, З. Ф. Евтихина, ДАН, 176, 456 (1967).
² J. B. Van der Plaats, P. Apintoweil, W. Bernds, Mutation Res., 7, 13 (1969). ³ Г. Ф. Гаузе, А. В. Лайко и др., ДАН, 175, 470 (1967). ⁴ S. Normark, H. G. Vroman, E. Matsson, J. Bacteriol., 97, 1334 (1969). ⁵ M. Matsuhashi, T. Sato et al., Abstr. VI Intern. Congr. Chemotherapy (Tokyo), 1969, p. 106.
⁶ F. C. Neuhaus, In: Antibiotics: Mechanism of Action, 1967. ⁷ Г. Ф. Гаузе, Ю. В. Дудник и др., ДАН, 181, 983 (1968). ⁸ C. R. Roe, K. S. You, N. O. Kaplan, Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 64 (1969).