

Ю. П. ВИНЕЦКИЙ, А. В. КУЛИНИЧ

ИНТЕГРАЦИЯ ФРАГМЕНТА ДОНОРНОЙ ДНК  
ПРИ ФАГОВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 4 VIII 1970)

Общей чертой всех трансформационных систем является интеграция фрагмента донорной ДНК в хромосому реципиента. В случае бактериальной трансформации механизм интеграции заключается во взаимодействии односпиральных участков ДНК донора и реципиента при сохранении непрерывности структуры реципиентной хромосомы (1, 2) (см. рис. 1а\*). При трансформации фага Т4 во время репликации родительского генома реципиентного фага в инфицированном бактериальном сфероласте образу-

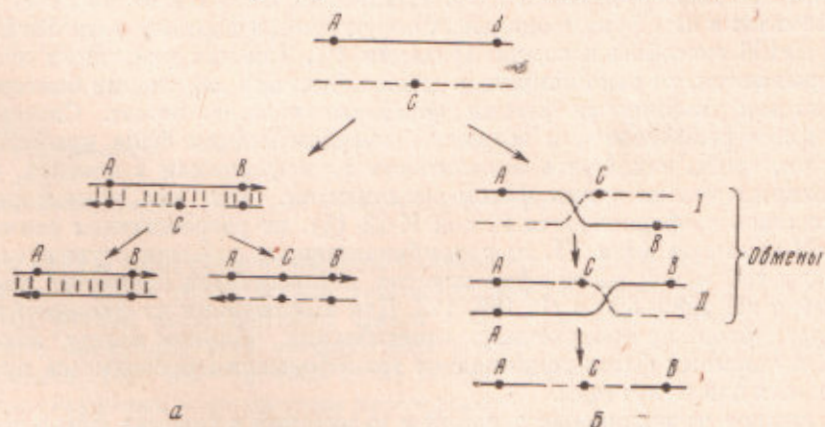


Рис. 1

ется несколько сотен дочерних реплик. Так как средний выход трансформантов фага Т4 из единичного сфероласта равен 1—2 частицам, а выход рекомбинантов пропорционален числу молекул донорной ДНК (3, 4), то можно предполагать, что в процессе рекомбинации между ДНК донора и реципиента участвуют 1—2 реплики генома реципиентного фага. В связи с этим можно рассмотреть две альтернативных возможности интеграции фрагмента донорной фаговой ДНК в реципиентный геном. При одном пути интеграция донорной ДНК в случае как фаговой, так и бактериальной трансформации одинакова по своему механизму, в основе которого лежит процесс вставки односпирального фрагмента донора в единую структуру хромосомы реципиента (рис. 1а). Согласно второй возможности, интеграция донорной фаговой ДНК является процессом, складывающимся из двух независимых актов генетической рекомбинации справа и слева от селективного маркера между донорным фрагментом и разными реципиентными ДНК (рис. 1б). Целью настоящей работы явилось проведение эксперимента, результат которого позволяет осуществить выбор между двумя указанными путями рекомбинации при фаговой трансформации.

\* Донорная ДНК показана на схеме прерывистой линией.

Принцип эксперимента таков. В результате инфицирования бактериальной клетки двумя гомологичными, но генетически различными фагами возникает смешанный фонд дочерних реплик. Если интеграция донорной и реципиентной ДНК осуществляется путем двух независимых обменов, то часть фаговых трансформантов должна иметь генетические признаки двух фагов-родителей, когда бактериальный сфероласт был инфицирован двумя

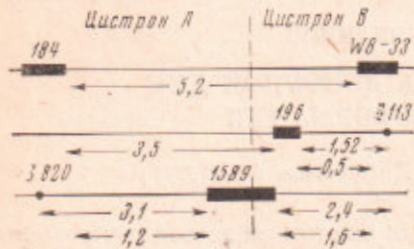


Рис. 2

маркированными фагами-реципиентами. В случае осуществления механизма вставки донорного фрагмента в одну реплику трансформанты должны нести признаки, присущие либо одному, либо другому реципиенту. В опыте были использованы фаги-реципиенты T4BrII 1589 и T4BrII 196, несущие соответственно слева и справа от rII<sup>+</sup> маркера условно-летальные термочувствительные мутации ts 820 и ts 113, локализованные так же, как и делеционные маркеры, в rII-области. Трансформация проводилась в сфероластах *Escherichia coli* K-12 ( $\lambda$ ). Донором служила ДНК двойного делеционного мутанта T4rII 184, W8-33, делеция в которой перекрывали крайние ts-мутации. Известно, что делеция 1589, захватывая часть В-цистрона в rII-гене, не вызывает в нем функциональных нарушений, и поэтому фаги T4rII 1589 и T4 Br196 способны к комплементации (5). Так как указанные делеции перекрываются, то рекомбинантов дикого типа при заражении бактериальных клеток указанными фагами образовываться не может. Способность двух фагов-реципиентов к взаимной комплементации была использована для того, чтобы исключить возможность трансформации в клетках, инфицированных только одним фагом-реципиентом. Так как трансформация проводилась в сфероластах *E. coli* K-12 ( $\lambda$ ), не разрешающих размножения rII-мутантов фага T4, то рекомбинационные события осуществлялись только в той малой части сфероластов, которые были совместно инфицированы и rII 1589, 820 и rII 196, 113. Для выключения из функционирования продуктов промежуточных генетических обменов между донорной ДНК и геномами фагов-реципиентов трансформация проводилась при 43°, летальных для ts-мутаций.

Взаимное расположение делеций и ts-мутаций в геномах фагов-реципиентов и делеций в доноре вместе с расстояниями между ними, определенными в фаговых скрещиваниях, представлено на рис. 2.

Генетические обмены в использованной системе могли иметь место между донорными фрагментами и реципиентными геномами слева в пределах расстояний между делецией 184 в доноре и делециями 1589 и 196 реципиентов и справа между правыми краями этих же делеций и донорной делецией W8-33. Однако конструкция системы предусматривает обязательное включение крайних маркеров реципиентов (ts 820 и ts 113) в геномы фагов-трансформантов, имеющих генотип 1589<sup>+</sup> и 113<sup>+</sup>.

Сфероласты *E. coli* K-12 ( $\lambda$ ), полученные при помощи обработки лизопимом и ЭДТА (6), были инфицированы обработанными мочевиной фагами-реципиентами T4rII 1589, ts820 и T4rII 196, ts113 со средней множественностью 10 фаговых эквивалентов в присутствии донорной ДНК фага T4rII 184, W8-33 (1  $\mu$ г/мл).

Опыты выполнялись с нативной, двутяжевой ДНК этого фага и с денатурированными препаратами, полученными при прогреве раствора (2  $\mu$ г/мл 0,01 М К-фосфатный буфер). Препарат ДНК, подвергнутый денатурации, был предварительно деградирован в размельчителе тканей до фрагментов со средним молекулярным весом  $5,6 \cdot 10^6$ . Молекулярный вес этого препарата ДНК был определен при помощи ультрацентрифуги «Spinco E».

После инкубации указанной смеси при 43° (2,5 часа) пробы были лизированы хлороформом, и их содержимое было высеяно с *E. coli* K-12 ( $\lambda$ ) на чашки с агаром Херши — Ротмана. Инкубация чашек проводилась при 30°. При этой температуре, как это было проверено в специальных опытах, фаги ts 820 и ts 113 имеют такую же эффективность посева на *E. coli* K-12 ( $\lambda$ ), как и фаг T4Br<sup>+</sup>.

Для проведения анализа генотипа содержимое каждой бляшки трансформанта было перенесено в индивидуальную пробирку с бульоном и подвергнуто капельному комплементационному спот-тесту на чашках с газонным *E. coli* K-12 ( $\lambda$ ) соответственно в смеси с индикаторными фагами T4BrPRT-153 и T4BrPW8-33. Этим приемом можно было определить генотип трансформантов в бляшке.

При трансформации в указанной системе возможно образование фаговых частиц следующих генотипов. Если справедливо предположение, в основе которого лежит механизм интеграции путем вставки донорного фрагмента в единую структуру реципиентной ДНК, то должны образоваться трансформанты типа 113, 820<sup>+</sup> и 820, 113<sup>+</sup>, но не должно быть рекомбинантных генотипов 113<sup>+</sup>, 820<sup>+</sup> (дикий тип) и 113, 820 (двойной ts-мутант).

Таблица 1

Доли генотипов трансформантов \*

ДНК донорного фага (1 мкг/мл)	Число учтенных бляшек	820 <sup>+</sup> , 113 <sup>+</sup>		820, 113 <sup>+</sup>		820 <sup>+</sup> , 113		820, 113	
		э	э/т	э	э/т	э	э/т	э	э/т
Нативная	257	0,53	1,0	0,2	0,91	0,195	1,08	0,075	1,07
Денатурированная	412	0,42	0,79	0,25	1,14	0,3	1,65	0,03	0,43

\* э — экспериментальные данные, т — теоретически ожидаемые.

В том случае если трансформанты появляются в результате двух последовательных актов генетической рекомбинации донорного фрагмента и различных реплик реципиентных фагов в их смешанном фонде, то можно ожидать появления всех четырех возможных генотипов (дикого, двойного ts-мутанта, 113, 820<sup>+</sup> и 820, 113<sup>+</sup>) в соотношениях, пропорциональных соответствующим генетическим расстояниям.

При вычислении долей трансформантов каждого класса была внесена поправка, учитывающая скрещивания между реципиентами в пределах расстояний от ts-мутаций и до центральных делеций. Величина поправки невелика. Так, доля класса 820<sup>+</sup>, 113<sup>+</sup> без коррекции вычисляется как 0,56; с учетом скрещиваний для всех возможных состояний эта же доля равна 0,53.

Результаты экспериментов приведены в табл. 1. Можно видеть, что генетический анализ трансформантов указывает на существование частиц всех четырех возможных генотипов. Количественное распределение трансформантов по классам находится в хорошем соответствии с величиной, ожидаемой из генетических расстояний между соответствующими маркерами. Отсюда можно сделать вывод, что интеграция донорной ДНК при фаговой трансформации заключается в рекомбинации между донорным и реципиентным фрагментами ДНК, происходящей в два независимых события, т. е. путем двух последовательных обменов.

Результат этого опыта может быть обсужден в связи с проблемой механизма генетических рекомбинаций у фага T4. Козинским (7) было показано, что при репликации фага T4 в бактериальной клетке образуются фрагменты ДНК, объединяемые в целые хромосомы перед созреванием дочерних фаговых частиц. Аналогия этого процесса с интеграцией ДНК при трансформации у фагов, где центральным партнером в скрещивании явля-

ется фрагмент хромосомы, дает основания для предположения, что рекомбинация у фага T4 есть следствие сборки небольших фрагментов реплицирующихся ДНК.

Институт общей генетики  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
14 VII 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> S. Lasko, B. Greenberg, K. Carlson, *J. Mol. Biol.*, **29**, 327 (1967).  
<sup>2</sup> R. Guerrini, M. S. Fox, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **59**, 429 (1968). <sup>3</sup> E. B. Goldberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **56**, 1457 (1966). <sup>4</sup> И. Д. Авдченко, Н. М. Александрова, Ю. П. Винецкий, *Микробиология*, **33**, 291 (1968).  
<sup>5</sup> S. P. Champre, S. Benzer, *J. Mol. Biol.*, **4**, 288 (1962). <sup>6</sup> Д. М. Гольдфарб, А. В. Авдеева и др., *Генетика*, № 7, 148 (1966). <sup>7</sup> A. W. Kozinski, P. B. Kozinski, *Virology*, **20**, 213 (1963).