

М. И. МЕКШЕНКОВ, Т. М. СЕРЕГИНА

## ФИЗИЧЕСКИЕ РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ ГЕНАМИ НА ХРОМОСОМЕ ФАГА Т4Д

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 30 XI 1973)

В предыдущей работе (<sup>1</sup>) было показано, что в получаемых методом прерванной инъекции (<sup>2, 3</sup>) комплексах *Escherichia coli* В — Т4Д после суперинфекции амбер-мутантом наблюдается эффект спасения функции и спасения маркера. Оба процесса идут с эффективностью, не зависящей от размера хромосомного фрагмента, переносимого в клетку, причем размер последнего пропорционален периоду времени инкубации, прошедшему с начала адсорбции фага до момента прерывания инъекции. Эти результаты были получены в отношении гена 1 фага Т4Д.

В данной работе совершенно аналогичные результаты были получены для ряда других генов фага Т4Д. На основе этого был разработан метод измерения расстояния между генами, состоящий в определении размера хромосомного фрагмента, содержащего оба рассматриваемых гена.

В работе использовали бактерии *E. coli* В и CR-63, фаг Т4Д — штамм дикого типа, его одиночные амбер-мутанты амВ24(1), амN134(33), амА458(50), амN66(16) и множественные амбер-мутанты амF12(2, 50), амF16(32, 33), амF19(11—16), амN134.A458(33, 50), амF12.F19(2, 50, 11—16) и амF16.F19(32, 33, 11—16). В скобках указаны номера генов, несущих амбер-мутации. Бактериальные штаммы В и CR-63, штамм фага Т4Д и его мутант амВ24 были получены от Д. М. Гольдфарба (Институт общей генетики АН СССР), мутанты амN134, амА458, амF12, амF16 и амF19 — от А. Н. Майсурына (Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов). Остальные множественные амбер-мутанты отбирали и идентифицировали, используя спот-тест, из потомства от скрещиваний соответствующих одиночных мутантов или мутантов серии амF. Фаговые штоки получали, заражая бактерии *E. coli* CR-63 (или В) в питательном бульоне фагом, снятым с отдельной негативной колонии. Используемые в опытах среды, реактивы и процедуры были описаны раньше (<sup>3</sup>). Схема эксперимента по определению кинетики переноса генов в комплексах *E. coli* В — Т4Д была в деталях описана в предыдущей работе (<sup>1</sup>). В принципе эксперимент состоит в том, что комплексы *E. coli* В — Т4Д, полученные при пониженной температуре (7°), обрабатывали на разных сроках инкубации при этой температуре в смесителе («Омпитикер», 14 000 об/мин), затем суперинфицировали тем или иным амбер-мутантом и определяли число комплексов, дающих негативные колонии на *E. coli* В. Понятно, что это число отражает долю комплексов, в которых к данному сроку инкубации фаг дикого типа переносит в клетку ам<sup>+</sup> аллель гена, несущего амбер-мутацию у суперинфицирующего фага. Результаты такого рода опытов представлены на рис. 1. Кривая 1 показывает, что при суперинфекции любым из одиночных амбер-мутантов ам<sup>+</sup> аллель в комплексах *E. coli* В — Т4Д обнаруживается сразу же после начала адсорбции фага дикого типа (нулевой момент времени на рис. 1). При этом доля таких комплексов растет линейно во времени, как это имеет место и при переносе Р<sup>32</sup> ДНК Т4 в аналогичных условиях (<sup>2, 3</sup>). Однако в комплексах, суперинфицированных амбер-мутантом по двум или

более генам (кривые *II, III, IV, V*), сначала никакого эффекта суперинфицирования не обнаруживается, но начиная с некоторого момента времени наблюдается линейное нарастание числа титрующихся на *E. coli* В комплексов. Нарастание идет с такой скоростью, что к 21-й мин. — к моменту завершения инъекции Р<sup>32</sup> ДНК Т4 (2, 3) — таких комплексов обнаруживается столько же, сколько в пробах, суперинфицированных одиночным амбер-мутантом. Как видно из кривых *II, III, IV, V*, для комплексов, суперинфицированных различными множественными амбер-мутантами, нарастание начинается в разные моменты времени, причем тем позже,

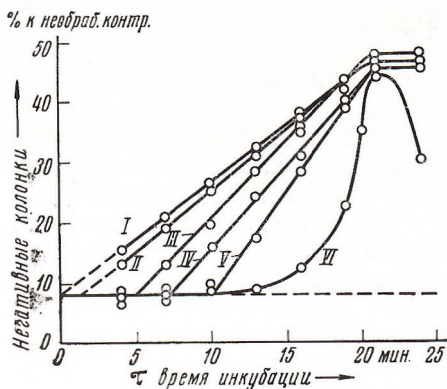


Рис. 1. Кинетика переноса в клетку ам<sup>+</sup> аллелей отдельных генов и их различных комбинаций в комплексах *E. coli* В — Т4Д при температуре 7°. I — комплексы, суперинфицированные после обработки в смеси теле одним из следующих амбер-мутантов: амВ24 (1), амN134 (33), амА458 (50), амN66 (16); II — амF19 (11—16); III — амN134, А458 (33, 50); IV — амF12, F19 (2, 50, 11—16); V — амF16, F19 (33, 32, 11—16); VI — обработанные несуперинфицированные комплексы *E. coli* В — Т4Д. Время  $t$  отсчитывается от момента начала адсорбции фага Т4Д

чем больше расстояние, разделяющее крайние мутантные гены данного суперинфицирующего фага. Так, для группы генов 11—16 (суперинфицирующий мутант амF19) нарастание начинается на 1,3 мин., для группы генов 2—16 (мутант амF12, F19) — на 5-й мин., для группы генов 33—41 (мутант амF16, F19) — на 7,3 мин. и для группы генов 33—50 (мутант амN134, А458) — на 10-й мин. после начала адсорбции. Следовательно, к указанным моментам времени в некоторых комплексах фаг дикого типа успевает перенести в клетку фрагмент хромосомы, содержащий ам<sup>+</sup>-аллель всех тех генов, которые несут мутацию у данного суперинфицирующего фага. Чем больше расстояние между крайними генами в данной группе, тем больше величина фрагмента, а значит и время его переноса в клетку.

Последующий линейный рост на кривых *II, III, IV, V*, как и в случае с одиночным суперинфицирующим фагом (кривая I), очевидно, отражает то обстоятельство, что по мере увеличения хромосомного фрагмента с течением времени увеличивается доля тех из них, которые содержат данную группу генов. Именно такая закономерность должна наблюдаться для популяции фаговых частиц с циклическими перестановками генов, если скорость переноса ДНК от фага в клетку постоянна во времени.

Подробнее этот вопрос был проанализирован в предыдущей работе (4). Здесь мы только отметим, что указанное совпадение данных эксперимента с ожидаемыми результатами свидетельствует о том, что эффективность выражения функции и спасения маркера в комплексах не зависит как от положения маркера на генетической карте, так и от размера переносимого в клетку фрагмента хромосомы. Аналогичный первому вывод был сделан и Г. Мозиг в отношении всех изученных ею маркеров у «легких» частиц (4).

Остается обсудить вопрос, действительно ли указанные выше интервалы времени соответствуют периоду вхождения минимальных по размеру фрагментов, содержащих данную группу генов. Если бы эффективность выражения функции и спасения маркера зависела от размера фрагмента, то и для комплексов, суперинфицированных одиночными амбер-мутантами, нарастание наблюдалось бы не сразу после начала адсорбции (нуле-

вой момент времени на рис. 1), а по истечении некоторого интервала времени, необходимого для переноса фрагмента достаточного размера. Кроме того, кинетика роста была бы нелинейной, так как с увеличением длины фрагмента, наряду с увеличением общего количества переносимых в клетку генов данного типа по всей популяции частиц Т4Д, увеличилась бы и вероятность процессов спасения функции и спасения маркера. В действительности из рассмотрения результатов экспериментов видно, что ни одного из перечисленных эффектов размера фрагмента на процессы спасения функции и спасения маркера не наблюдается. Заметим, что высокая вероятность обоих процессов, не зависящая от размера фрагмента и полностью соответствующая ожидаемой для популяции частиц с циклическими перестановками, свидетельствует о том, что хромосомные фрагменты фага Т4 в нашей системе многократно реплицируются, прежде чем вступают в рекомбинацию с хромосомой суперинфицирующего мутантного фага. К тому же выводу пришли Дерман и Парма в отношении репликации частичного генома дефективных частиц фага Т4<sup>(5)</sup>.

Все сказанное выше дает основание для расчета расстояния между генами (включая и размеры самих генов) по интервалу времени, прошедшего с нулевого момента до начала нарастания (кривые II, III, IV, V). Принимая во внимание, что время переноса полного генома равно 21 мин., мы рассчитали относительные расстояния для каждой из исследованных групп генов. Эта частичная карта физических расстояний между генами представлена на рис. 2 (цифрами обозначены номера генов). Для сравнения на рис. 2 приведен также соответствующий участок генетической карты и физической карты, построенной Г. Мозиг на основании частот разделения генов у «легких» частиц<sup>(6)</sup>. Из рис. 2 видно, что наши данные хорошо согласуются с результатами Г. Мозиг и заметно отличаются от результатов генетического картирования, в особенности для расстояний между генами 33 и 50, 11 и 16 и 2 и 50. Это понятно, если иметь в виду, что измерения межгенных расстояний по методу Мозиг и предложенным нами способом, в отличие от генетического картирования, не зависят от частот рекомбинации между маркерами.

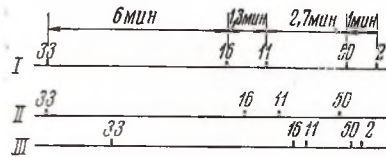


Рис. 2. Частичная карта физических расстояний между генами бактериофага Т4Д. I — физические расстояния, определенные по времени переноса хромосомных фрагментов (данные рис. 1); II — физические расстояния, полученные по методу Мозиг<sup>(6)</sup>; III — расстояния между маркерами на генетической карте Т4Д<sup>(7)</sup>. Цифры над линиями — номера генов

Институт биологии развития  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
25 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> М. И. Мекшенков, Т. М. Серегина, ДАН, т. 243, № 5, 197 (1973). <sup>2</sup> М. И. Мекшенков, Р. Д. Гусейнов, ДАН, т. 191, № 2, 457 (1970). <sup>3</sup> М. И. Мекшенков, Р. Д. Гусейнов, Молекулярная биология, т. 5, в. III, 444 (1971). <sup>4</sup> G. Mosig, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 56, 1177 (1966). <sup>5</sup> A. H. Doerman, D. H. Parma, J. Cell. Physiol., v. 70, Suppl. 1, 147 (1967). <sup>6</sup> G. Mosig, Genetics, v. 59, 137 (1968). <sup>7</sup> R. S. Edgar, W. B. Wood, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 47, 857 (1966).