

А. П. ПЕХОВ, В. П. ЩИПКОВ, Н. И. БУЯНОВА

**О НОВОМ ВАРИАНТЕ ПОЛОВОГО ФАКТОРА F
У ESCHERICHIA COLI**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 30 X 1974)

Как известно, генетический анализ бактерий различных систематических групп все еще осложняется тем, что у абсолютного большинства бактериальных видов не найдены системы рекомбинации, обусловленные наличием в клетках одного из конъюгационных факторов фертильности, в частности полового фактора F, подобного фактору F у *Escherichia coli* K-12. Между тем анализ неоднократно предпринимавшихся попыток выявить такой половой фактор у других штаммов кишечной палочки и отдельных штаммов других видов бактерий позволил предположить, что бактерии большого числа штаммов могут нести фактор этого типа, но его идентификация затруднена тем, что в отличие от *E. coli* K-12 он находится в клетках таких штаммов в репрессированном состоянии, вследствие чего конъюгационные функции клеток оказываются выключенными, и они не осуществляют генетический перенос с высокой частотой ⁽¹⁾.

Руководствуясь приведенным выше предположением, мы предприняли поисковые исследования, цель которых заключалась в том, чтобы вначале индуцировать дерепрессированные мутанты (drd) * полового фактора, обнаруженного нами ранее в клетках одного из условно патогенных серологически типизируемых штаммов *E. coli* ⁽²⁾, а затем, используя культуры клеток, несущих дерепрессированный мутант этого фактора, выделить из них штаммы клеток-доноров, сходных по своим свойствам с клетками-донорами типа Hfr. Поскольку в проведенных исследованиях получены положительные результаты, некоторые из них приводятся в настоящем сообщении.

Поиски дерепрессированных мутантов полового фактора проводили в клетках F⁺ условно патогенного штамма *E. coli*, относящегося к серотипу 06: K54(L) : H10 и обозначаемого в нашей коллекции шифром AP1. Клетки этого штамма обладают трансмиссивным половым фактором FB1, но характеризуются резистентностью к специфическим «мужским» фагам, лизирующим клетки донорских штаммов, происходящих от *E. coli* K-12, и крайне низкой частотой хромосомного переноса в скрещиваниях с серологически нетипизируемыми и типизируемыми реципиентными штаммами *E. coli* (табл. 1). В качестве реципиентов генетического материала использовались серологически нетипизируемые штаммы *E. coli* AB1157 Thr⁻Leu⁻Pro⁻Arg⁻His⁻Lac⁻S^r ⁽³⁾ и C600 Thr⁻Leu⁻S^r ⁽⁴⁾, являющиеся производными штамма K-12, а также селекционированный в нашей лаборатории серологически типизируемый штамм *E. coli* AP13 Trp⁻S^r, относящийся к серогруппе 0100 ⁽⁵⁾.

Для индуцирования drd-мутаций фактора FB1 популяцию бактерий штамма AP1 обрабатывали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином

* В статье приняты следующие сокращения: drd — дерепрессированный мутант полового фактора, Thr — треонин, Leu — лейцин, Pro — пролин, Arg — аргинин, His — гистидин, Lac — лактоза, Trp — триптофан, S^s/S^r — чувствительность/устойчивость к стрептомицину.

Донорские свойства полученных штаммов *E. coli* серотипа 06:K54(L):H10

Донорские штаммы				Реципиентные штаммы <i>E. coli</i>	Частота появления рекомбинантов (на 1 донорскую клетку)					
Обозначение	Тип фертильности	Фактор фертильности	Чувствительность к специфическим «мужским» фагам		Thr ⁺ Leu ⁺ St ^r	Pro ⁺ St ^r	Arg ⁺ St ^r	His ⁺ St ^r	Trp ⁺ St ^r	Lac ⁺ St ^r
AP1	F ⁺	FB1	—	S600 AB1157 AP13	7·10 ⁻⁸ <10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸
AP2	F ⁺	FB1drd	+	S600 AB1157 AP13	4·10 ⁻⁶ 4·10 ⁻⁷	6·10 ⁻⁷	6·10 ⁻⁷	6·10 ⁻⁷	4·10 ⁻⁷	1·10 ⁻⁷
AP3	Hfr	FB1drd	+	S600 AB1157 AP13	3·10 ⁻³ 2,5·10 ⁻³	9·10 ⁻⁴	4·10 ⁻⁴	1·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁶	4·10 ⁻⁶ 3·10 ⁻⁶

(200 мкг/мл) по методике, описанной ранее (6). После высева обработанных образцов на чашки с МПА и выращивания посевов при 37° клетки выросших колоний изучали затем на чувствительность к «мужскому» фагу f2, а также на способность к хромосомному переносу в скрещиваниях с клетками-реципиентами S600. Фагочувствительность определяли пересевом колоний на поверхность МПА и нанесением в центр каждой колонии-реплики капли фильтрата фага f2, имеющего титр около 10¹⁰ частиц/мл, с последующим инкубированием чашек в течение 8—12 час. при 37°. Способность к хромосомному переносу (Thr⁺Leu⁺) определяли путем реплицирования колоний на поверхность селективной среды в чашках, покрытой около 5×10⁷ предварительно отмытых с помощью центрифугирования клеток-реципиентов S600.

В результате проведенных экспериментов из 1560 изученных колоний удалось вывить 45 колоний, клетки которых характеризовались чувствительностью к фагу f2, но не показывали хромосомного переноса в скрещиваниях на плотной среде. Однако при дальнейшей проверке таких клеток в скрещиваниях с клетками-реципиентами S600 в жидких средах был отобран происходящий из одиночной колонии штамм AP2, клетки которого наряду с фагочувствительностью характеризовались также способностью к хромосомному переносу с более высокой частотой по сравнению с клетками исходного штамма AP1. Аналогичным образом клетки-доноры AP2 вели себя и в скрещиваниях с клетками-реципиентами AB1157 и AP13 (табл. 1). Кроме того, они сохраняли антигенные признаки бактерий исходного штамма. Оценивая полученные результаты, мы пришли к заключению, что FB1-фактор, присутствующий в клетках штамма AP2, представляет собой мутантный вариант дерепрессированного типа, который может быть обозначен как половой фактор FB1drd.

Чтобы получить данные о состоянии изучаемого полового фактора по отношению к бактериальной хромосоме, были проведены эксперименты, в которых генетические рекомбинанты, селекционированные в предыдущих опытах из скрещиваний клеток AP2 с клетками-реципиентами S600, проверяли на способность осуществлять генетический перенос и на чувствительность к специфическим «мужским» фагам. Эти эксперименты показали, что для полового фактора FB1drd характерна низкая частота мобилизуемого им хромосомного переноса, но высокая частота собственного переноса, близкая к 100%. Анализируя эти данные, мы сделали дальней-

шее заключение о том, что половой фактор FB1drd находится в клетках AP2 в автономном состоянии и что эти клетки по типу фертильности продолжают оставаться клетками F⁺.

Задача наших последующих исследований состояла в том, чтобы из культур штамма AP2F⁺, клетки которого несут фактор FB1drd в автономном состоянии, выделить штамм клеток, несущих этот половой фактор в интегрированном состоянии и действующих как клетки типа Hfr. Для решения этой задачи взвеси клеток штамма AP2 подвергали воздействию ультрафиолетового излучения в дозах, допускающих выживаемость 1—3% бактерий. После этого обработанные образцы высевали на чашки с МПА, которые инкубировали 18 час. при 37°. Выросшие колонии перенесли затем методом реплик на чашки с селективной средой, покрытой густой взвесью клеток-реципиентов С600, и посеы инкубировали 48 час. при 37°.

Среди проверенных указанным выше способом 45200 колоний была обнаружена одна колония, перенос которой на селективную среду сопровождался формированием генетических рекомбинантов Thr⁺Leu⁺S^r. В дальнейших опытах из этой колонии была получена клоновая культура, названная штаммом AP3, и клетки этого штамма скрещивали с клетками-реципиентами С600, АВ1157 и AP13 путем двухчасового выдерживания смесей в жидких средах при 37°. Как показали проведенные скрещивания, частота появления в них генетических рекомбинантов разных классов была гораздо более высокой по сравнению со скрещиваниями, где донорами являлись клетки штамма AP2 (табл. 1). Поскольку клетки-реципиенты АВ1157 являются множественными ауксотрофами, то в скрещиваниях AP3×AB1157 можно было наблюдать также и различные частоты передачи разных хромосомных маркеров. Другими словами, наблюдался «градиент передачи» хромосомных маркеров, обычно характерный для клеток, несущих половой фактор в интегрированном состоянии, т. е. для клеток донорских штаммов типа Hfr. То, что «градиент передачи» в данном случае действительно имеется, было подтверждено при анализе наследования рекомбинантами из этих скрещиваний и неселективных маркеров. Далее, рекомбинанты Thr⁺Leu⁺S^r, Pro⁺S^r, селекционированные из скрещиваний AP3×AB1157 с высокой частотой, не наследовали полового фактора, тогда как рекомбинанты Lac⁺S^r, селекционируемые с наиболее низкой частотой, в 50% случаев наследовали такой фактор. Эти данные позволяют предполагать, что клетки штамма AP3 передают хромосомные маркеры Thr⁺, Leu⁺, Pro⁺ и Arg⁺ в начале переноса, тогда как маркер Lac⁺ является, вероятно, конечным маркером.

Чтобы получить дополнительные данные о том, что высокофертильные клетки штамма AP3 несут половой фактор в интегрированном состоянии, их обрабатывали акридином оранжевым по стандартной методике (1). Однако такие неоднократно повторяемые обработки не приводили к удалению из этих клеток полового фактора. Наконец, дополнительное изучение бактерий штамма AP3 в линейной реакции агглютинации со стандартными ОВ-коли-сыворотками показало, что они сохранили соответствующие антигенные признаки бактерий исходного штамма. Таким образом, выделенный штамм AP3 может быть охарактеризован как донорский штамм бактерий *E. coli* Hfr, принадлежащих к серотипу 06:K54(L):H10 и несущих половой фактор FB1drd.

Результаты наших исследований, в ходе которых был идентифицирован новый вариант полового фактора F, подтверждают справедливость исходного предположения (1), что помимо классического полового фактора F, который характерен для клеток *E. coli* K-12, существуют и другие варианты фактора F, но идентификация их затруднена из-за наличия в цитоплазме синтезируемых под их контролем репрессорных молекул. Вместе с тем, идентификация фактора F в серологически типизируемых *E. coli* и выделение в связи с этим донорского штамма Hfr бактерий этого

вида открывает новые перспективы для изучения генетического контроля антигенных свойств бактериальной клетки. Как известно, штаммы *E. coli* К-12 для этих целей не пригодны.

Университет дружбы народов
им. П. Лумумбы
Москва

Поступило
30 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. П. Пехов, В сб. Проблемы современной иммунологии, М., 1972, стр. 107.
² Н. И. Буянова, В. П. Щипков, А. П. Пехов, Бюлл. эксп. биол. и мед. т. 9, 106 (1973).
³ P. Howard-Flanders, L. Theriot, Genetics, v. 53, 6, 1137 (1966). ⁴ R. Clowes, D. Rowley, J. Gen. Microbiol., v. 11, 250 (1954). ⁵ Н. И. Щипкова, А. П. Пехов, В. П. Щипков, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 10, 109 (1973). ⁶ С. Н. Руднева, А. П. Пехов, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 7, 100 (1969). ⁷ Y. Hirota, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 46, 1, 57 (1960).