

УДК 576.859.095

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. Г. ЛАДЫГИНА, Г. И. БУРД, М. А. ТАРШИС

**ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МУТАНТА
ACHOLEPLASMA LAIDLAWII С ДЕФЕКТОМ
В ТРАНСПОРТЕ УГЛЕВОДОВ**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 1 IV 1976)

В настоящее время совершенно очевидно, что окончательное выяснение молекулярной природы бактериальных транспортных систем и путей сопряжения энергии с транспортом возможно только на модели соответствующих мутантов, у которых имеются дефекты в переносчиках (¹, ²). Ранее на клетках *Acholeplasma laidlawii* и выделенных из них мембранных везикулах нами была обнаружена общая система транспорта глюкозы и ее неметаболизируемого аналога 3-О-метилглюкозы (3-МГ) (³⁻⁵). К сожалению, генетический подход к выяснению природы углеводного переносчика пока ограничен из-за совершенно неразвитой генетики микоплазм (⁶, ⁷). Имеются лишь отдельные сообщения о резистентных к антибиотикам штаммах и о выделении мутанта, по-видимому, с дефектом в синтезе α -глюкозидазы (⁸⁻¹⁰). В настоящей работе мы впервые получили биохимический мутант *A. laidlawii*, у которого имеются дефекты в системе мембранного транспорта углеводов.

Исходный штамм *A. laidlawii* (получен от проф. Келлера, Иена, ГДР, через Г. Я. Каган, Москва), чувствительный к стрептомицину, предварительно генетически маркировали, выращивая на среде I (состав на 1 л: 20 г триптозы, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г CH_3COONa , 0,5 г KCl , 3,2 г триса, 1% глюкозы и 2% бычьей сыворотки, pH 8,0) с высоким содержанием стрептомицина (500 мкг/мл). Поскольку используемые в работе индикаторные среды содержали 2,3,5-трифенилтетразолий-бромид, восстанавливающийся только в нейтральной области pH, то предварительно был выделен промежуточный спонтанный мутант PTL-21, способный к росту на среде со значением pH 6,8–7,2. Затем клеточную суспензию штамма PTL-21 в 0,2 M трис-ацетатном буфере, pH 6,0, обрабатывали в течение 30 мин. нитрозогуанидином (500 мкг/мл), дважды промывали 200 мл этого же буфера и фильтровали через ультрафильтры HAWP («Миллипор») с диаметром пор 0,45 мкм для получения отдельных клеток. Фильтрат высевали на среду I с 1,3% агара и 0,002% тетразолия. На этой среде клетки, сбраживающие глюкозу, сдвигают pH среды в кислую область и, восстанавливая тетразолий, образуют бесцветные колонии. Мутантные клетки не сбраживают глюкозу и образуют красные колонии. Эти колонии подвергались очистке путем многократного клонирования на чашках с этой же средой. Мутант сохранял исходный генетический маркер — резистентность к стрептомицину. Полученный штамм PTL-S затем выращивали в течение 18–20 час. на среде I. Метод выделения клеток и определения их транспортной активности для радиоактивных углеводов описан ранее (³). Фосфорилирующую активность бесклеточных экстрактов измеряли после 30-минутной инкубации их с ¹⁴C-глюкозой (4 мкМ) в присутствии АТФ с последующим осаждением фосфатов Zn—Ba-реактивом (¹¹). Скорость накопления клетками фосфорных эфиров с глюкозой в качестве субстрата измеряли методом колоночной хроматографии (¹¹). Накопление

клетками молочной кислоты определяли по тесту фирмы «Бёрингер», ФРГ.

Нами изучены начальные (15 мин. инкубации) скорости транспорта ^{14}C -глюкозы и ее неметаболизируемого аналога 3-О-метилглюкозы (3-МГ). Поглощение D - ^{14}C -глюкозы клетками *A. laidlawii* при концентрации 33 мкМ для исходного штамма составляет 22 080, для PTL-21 18 900, для PTL-S 2130 имп/мин на 1 мг белка; поглощение 3-О-метил- ^3H -D-глюкозы при концентрации 10 мкМ для исходного штамма 8440, для PTL-21 7820, для PTL-S 1150 имп/мин на 1 мг белка.

Совершенно очевидно, что транспортная активность глюкозы у PTL-S очень низка и составляет около 10% таковой у PTL-21. Об этом же свидетельствует и низкая скорость образования мутантом PTL-S лактата из

Таблица 1

Аккумуляция продуктов утилизации ^{14}C -глюкозы клетками *A. laidlawii*

Штамм	Общая экстрагируемая активность, имп/мин на 1 мг белка	Активность свободной глюкозы		Активность фосфатов глюкозы	
		имп/мин на 1 мг белка	%	имп/мин на 1 мг белка	%
Исходный	1600	300	19	960	60
PTL-21	1800	370	21	1210	67
PTL-S	480	120	25	350	73

Примечание. Общая экстрагируемая активность для всех штаммов 100%.

глюкозы. (Количество молочной кислоты у исходного штамма составляет 45,1 мкг на 1 мл белка, у штамма PTL-21 34,9, у штамма PTL-S 3,0.)

Поскольку нарушенная аккумуляция клетками глюкозы может быть связана с повреждением не только транспорта углевода, но и его внутриклеточной утилизации, то представлялось необходимым измерить фосфорилирующую активность бесклеточных экстрактов. Накопление фосфорных эфиров глюкозы для исходного штамма составляет 3540 имп/мин на 1 мг белка, для PTL-21 3250, для PTL-S 4010 имп/мин.

Следовательно, можно полагать, что уменьшение аккумуляции глюкозы мутантом не связано с дефектом в ее утилизации. Еще одним подтверждением этого предположения может служить практически одинаковое внутриклеточное соотношение между свободными сахарами и заряженными продуктами ее утилизации во всех исследуемых штаммах (табл. 1). И, наконец, основным доказательством того, что мутационное повреждение затрагивает именно систему переносчика глюкозы, а не ее метаболизма, являются данные по транспорту 3-МГ. Совершенно очевидно, что транспорт не утилизируемой 3-МГ также повреждается. Предварительные эксперименты показывают, что, в отличие от исходного штамма и PTL-21, у PTL-S транспорт глюкозы и 3-МГ не подчиняется концентрационной кинетике Михаэлиса — Ментен. Весьма вероятно, что изучаемая мутация затрагивает синтез белкового переносчика (или его регуляторную область), участвующего в транспорте глюкозы и 3-МГ.

Второй Московский медицинский институт им. Н. И. Пирогова
Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
1 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. G. Le Fevre, In: Curr. Topics in Membrane and Transport, v. 7, 1975, p. 148.
- ² R. D. Simoni, P. W. Postma, Ann. Rev. Biochem., v. 44, 523 (1975).
- ³ M. A. Tarshis et al., Europ. J. Biochem., v. 40, 171 (1973).
- ⁴ L. F. Panchenko, N. S. Fedotov, M. A. Tarshis, Folia Microbiol., v. 20, 480 (1975).
- ⁵ M. A. Tarshis et al., J. Bacteriol., v. 125, 1 (1976).
- ⁶ S. Razin, In: Adv. Microbiol. Physiol., v. 10, 1973, p. 1.
- ⁷ J. Maniloff, A. Liss, In: Viruses, Evolution and Cancer, 1974, p. 583.
- ⁸ C. E. Folsome, J. Gen. Microbiol., v. 50, 43 (1968).
- ⁹ J. L. Schwartz, D. Perlman, J. Antibiot., v. 24, 577 (1971).
- ¹⁰ M. L. Slater, C. E. Folsome, Nature New Biol., v. 229, 417 (1971).
- ¹¹ M. A. Tarshis, V. L. Migoushina, L. F. Panchenko, FEBS Letters, v. 31, 111 (1973).