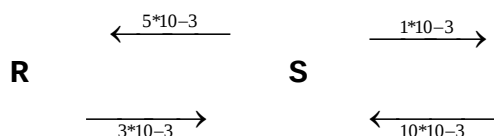


УДК 579.25; 579.87

Е. С. Милько, Н. С. Егоров, Г. И. Королева

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИССОЦИАТИВНЫХ ПЕРЕХОДОВ *RHODOCOCCUS RUBROPERTINCTUS*

В настоящее время считают, что причиной возникновения диссоциантов могут быть случайные мутации, перенос генетического материала (конъюгация, трансформация, трансдукция), однако ведущую роль в диссоциативных переходах отводят мигрирующим генетическим элементам. Так, R- Λ S переход у сальмонелл связывают с инверсией определенного сегмента ДНК (Хесин, 1985), у некоторых других энтеробактерий - с наличием плазмид (Беляков и др., 1985), у микобактерий - с процессом лизогенизации (Mizuguchi, 1984). У культуры *Rhodococcus rubropertinctus* 104 (*Mycobacterium laticolum* 104) методом Лурия и Дельбрюка мы определили направление и частоту диссоциативных переходов:



Было высказано предположение об участии умеренного фага 104 S, выделенного из *R. rubropertinctus*, в диссоциации культуры на три варианта (Милько, Егоров, 1986). Изучение лизогенных свойств диссоциантов по отношению к выделенному фагу установило истинную лизогенность 5-варианта и возможную - двух других. Молекулярная гибридизация рестрикционных фрагментов ДНК диссоциантов с Λ P-ДНК фага (Обухова и др., 1985) показала, что геном трех вариантов содержит нуклеотидные последовательности, гомологичные последовательности ДНК фага 104 S, при этом наборы гибридизующихся фрагментов ДНК различаются, т. е. все три диссоцианта лизогенны по фагу 104 S, но, вероятно, отличаются по характеру встройки профа-га в геном клетки.

В Λ -клетках профаг встраивается, возможно, в иной, чем в S-клетках, участок хромосомы, который приводит к синтезу капсульного полисахарида, принципиально отличного от экзогликана S- и M-клеток (Милько и др., 1983а) и препятствующего адсорбции фага на клеточных стенках. Добавленный извне фаг не снижает числа клеток диссоциантов, но усиливает только R-f-S переход почти на два порядка. Аналогичные результаты получены на *Mycobacterium smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum* (Mizuguchi, 1984). Это усиление можно объяс-

40

нить рекомбинацией фага с модифицированным профагом и восстановлением исходной нуклеотидной последовательности.

Элиминирующие плазмиды агенты (ЭПА) - акридиновый оранжевый, бромистый этидий - усиливают только M-->S переход (Милько, Егоров, 1986а). Поэтому можно было предположить, что фаг в M-клетках находится в виде плазмиды, или связан с плазмидой, или часть его образует плазмиду либо связана с плазмидой. Было выделено 12 S-колоний, возникших после обработки Af-клеток ЭПА. Оказалось, что половина из них потеряла способность к диссоциации, одновременно клетки стали чувствительными к фагу и не выделяли его в среду. У такого недиссоциирующего клона 1э в ДНК обнаружены последовательности, гомологичные фаговой ДНК, т. е. при элиминации теряется только часть профага. В связи с тем что при обработке S-варианта ЭПА обнаруживаются S1-колонии, которые при диссоциации образуют только R-колонии, то, вероятно, при S->M переходе часть профага встраивается в плазмиду, имеющуюся, по косвенным данным, в S-клетках. Спонтанно возникшие нелизогенные клоны S-варианта не диссоциируют. Таким образом, при потере профага или его части клетки утрачивают способность к диссоциации.

Наши эксперименты включали лизогенизацию фагом 104 S недиссоциирующих клонов 5-варианта *Rhodococcus rubropertinctus*, возникших спонтанно или после обработки ЭПА, определение способности клеток к расщеплению на варианты и выделение плазмиды из родо-кокка. На основании всех имеющихся данных и полученных нами результатов составлена возможная схема взаимных переходов клонов диссоциантов. В опытах использовали два недиссоциирующих клона S-варианта: SH, возникший спонтанно, и 51э, полученный после обработки At-клеток бромистым этидием.

Лизогенизацию фагом проводили при множественности инфекции 0,1 и температуре 30° в течение 3 ч. После лизогенизации из выделенных 154 субклонов 1э-клона и 127 субклонов Дн-клона взяли по 7 субклонов, которые были по методу штрихов устойчивы к фагу. У этих субклонов определяли: 1) чувствительность к фагу 104 S методом агаровых слоев, 2) способность выделять фаг в культуральную жидкость при длительном культивировании, 3) способность к расщеплению на варианты (таблица). Контролем служили нелизогенизированные субклоны. Оказалось, что только два субклона - 1э-4 и 5н-3 - устойчивы к фагу и выделяют его в среду, т.е. стали лизогенными. Одновременно у них восстановилась способность к диссоциации на R- и M-варианты.

Выделение плазмиды из Корине- и нокардиоподобных бактерий представляет значительные трудности, поскольку их клетки, во-первых, устойчивы к действию лизоцима, особенно R-клетки во-вторых, образуют много экзополисахаридов, особенно M-клетки, что создает дополнительные трудности при обработке больших объемов среды (Милько, Егоров, 1983); в-третьих, обладают значительной экзонуклеазной активностью, особенно Л1-клетки (Mizuguchi, 1984).

Впервые плазида выделена из микобактерий в 1979 г. (Crawford, Bates, 1979), при этом были использованы клетки, выросшие в 1 л среды. Из *R. erythropolis* выделена плазида, определяющая способность клеток к трансформации (Tadaharu et al., 1983). Плазмиды с молекулярной массой 40 и 50 МД (Романов и др., 1984), выделенные из *R. opacus*, не определяют способности клеток к использованию этана. При исследовании носительства плазмид у 25 штаммов непатогенных кориниебактерий у 11 из них обнаружено по одной плазмиде размером 4,2-5,5 тыс. пар нуклеотидов (Sandoval et al., 1985). Эти плазмиды не детерминировали ни один из испытанных признаков: продукцию бактериоцина, устойчивость к антибиотикам, мышьяку, ртути, ко-

41

бальту. Из *Nocardia mediterranei* выделена плазида размером 23,7 тыс. пар нуклеотидов (Moretti et al., 1985). Найдены линии: не содержащие плазмиду; содержащие плазмиду только в интегрированной форме; содержащие плазмиду либо в свободной, либо в интегрированной форме (в последнем случае интеграция сайт-специфична). Таким образом, в большинстве случаев функции плазмид у корине- и нокардиоподобных бактерий не известны.

Для выделения плазмиды из *Rhodococcus rubropertinctus* мы использовали метод лизиса, разработанный ранее (Обухова и др., 1982). Обработывали одновременно клетки, выросшие не менее чем в 1 л среды. Полученный лизат осветляли добавлением ацетата калия или NaCl, центрифугировали, супернатант депротеинизировали. Для подавления нуклеазной активности применяли саркозил и ЭДТА. Из водной фазы плазмидную ДНК осаждали этанолом или изопропанолом. Образцы анализировали в агарозном геле электрофорезом.

Из 5-варианта выделена плазида, молекулярную массу которой определяли с помощью рестрикционного анализа (использовали ре-стриктазы Msp I и Cfr 13 I). В качестве маркеров использовали ДНК фага K, обработанную рестриктазой Hind III (рис. 1). Размер плазмиды, определенный по сумме рестрикционных фрагментов, полученных при расщеплении ДНК рестриктазой Cfr 13 I, составил 17 тыс. пар нуклеотидов. При расщеплении ДНК рестриктазой Msp I отчетливо различимы только два фрагмента, сумма которых составляет 11 тыс. пар нуклеотидов. Все это позволяет реально предполагать присутствие плазмиды в 5-варианте.

Для иллюстрации всех сведений, полученных ранее и изложенных в настоящей статье, предложена формальная схема взаимных переходов

42

клонов диссоциантов *R. rubropertinctus* (рис. 2). Она объясняет также наличие разных диссоциантов у других штаммов этого вида ро-дококков (микобактерий): RSM, или RS, или SM (но не RM), или не-диссоциирующих штаммов (Милько, Егоров, 1978).

На основе схемы предложено два способа получения недиссоциирующих клонов 5-варианта для стабилизации выхода синтезируемых клетками практически важных веществ: 1. Поиск в популяции клеток, чувствительных к фагу; но это трудоемкий метод, требующий выделения фага, для чего необходима индикаторная культура; 2. Обработка Л1-клеток элиминирующими плазмиды агентами и поиск среди возникших S-клеток недиссоциирующих клонов, составляющих около 50%. Последний метод подтвержден также на *Mycobacterium mucosum* (Милько и др., 1983).

Таким образом, установлено, что диссоциация и лизогенность ро-дококка взаимосвязаны. Диссоциативные переходы обусловлены не лизогенизацией, как указывается в литературе, а, вероятно, перестройкой генетического материала клетки, в которой активное участие принимает ДНК умеренного фага, присутствующего во всех трех вариантах, и плазмиды. При потере профага или его части клетки теряют способность к расщеплению на варианты. Авторы приносят глубокую благодарность вед. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии МГУ А. А. Колесникову за консультацию и методическую помощь в работе.

43

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беляков В. Д., Каминский Г. Д., Каминская С. Г. 1986. Гипотеза направленной самоперестройки популяции микроорганизмов и ее общебиологическое значение//Журн" микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. № 1. 93-100.

Милько Е. С., Егоров Н. С. 1978. Естественная изменчивость некоторых сапрофитных микобактерий//Микробиология. 47, № 3. 556-557.

Милько Е. С., Егоров Н. С. 1986а. О роли умеренного фага в диссоциации бактерий//Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 4. 6-19.

Милько Е. С., Егоров Н. С. 1986б. Экологическая роль процесса расщепления популяций бактерий на варианты//Экологическая роль микробных метаболитов. М. С. 2011-2-12.

Милько Е. С., Ботвинко И. В., Степанова Р. А., Егоров Н. С. 1983а. Сравнительное изучение химического состава и некоторых свойств полисахаридов капсул М-, S- и Δ -вариантов *Mycobacterium lactico-gmt*//Микробиология. 52, № 3. 388-391.

Милько Е. С., Егоров Н. С., Обухова Н. А., Толдаев С. В. 1983б. Мутанты *Mycobacterium lacticum* и *Mycobacterium mucosum*, не расщепляющиеся на варианты//Прикл. биохим. и микробиол. 19, № 1. 111-115.

Обухова Н. А., Егоров Н. С., Бабенко Ю. С., Милько Е. С. 1982. Ферментативный лизис клеток R-, S- и M-форм *Mycobacterium lacticum* и условия, влияющие на этот процесс//Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. № 8. 103-106.

Обухова Н. А., Колесников А. А., Маслов Д. А., Резепкина Л. А., Милько Е. С. 1985. Некоторые физико-химические свойства ДНК умеренного фага и возможное влияние его на 'изменчивость *Mycobacterium lacticum*/1 //Микробиология. 54, № 4. 641-646.

Романов В. А., Столяр С. М., Пинчук Г. Э. 1984. Плазмиды бактерий, облигатно и факультативно использующих газообразные углеводороды//Микробиол. журн. 46, № 5. 70-71.

Хесин Р. Б. 1985. Непостоянство генома.

M. Crawford J. T., Bates J. H. 1979. Isolation of plasmids from mycobacteria//Infect. and Immunol. 24, N 3. 979-981.

Mizuguchi Y. 1984. Mycobacteriophages//The mycobacteria. New York; Basel. P. 641-662.

Moretti P., Hintermann G., Hiltner R. 1985. Isolation and characterization of extra-chromosomal element from *Nocardia mediterranea* Plasmid. 14, N 2. 126-133.

Sandoval H., Real G., Mateos L. M., Aguilar A., Martin J. F. 1985. Screening of plasmids in non-pathogenic corynebacteria//FEMS Microbiol. Lett. 27, N 1. 93-98.

Tadaharu H., Yoshida M., Yukiteru O. 1983. Plasmid-determined transformation of cis-alienol and sclareol in *Rhodococcus erythropolis* J. T. S.-131//Agric. and Biol. Chem. 47, N 4. 781-786.

Поступила в редакцию 18.02.88.

E. S. Milko, N. S. Egorov, G. I. Koroleva

THE GENETIC BASIS OF DISSOCIATIVE TRANSITION IN *RHODOCoccus RUBROPERTINCTUS*

The 17 kb plasmid was isolated from *Rhodococcus rubropertinctus*. It is shown, that the lysogenisation of non-dissociating S-variant leads to the restoration of it's ability to dissociate at R- and Af-variants. It is established, that dissociative transitions of the strain depend on the rearrangements genetic material of cell, the temperate phage present in all three variants and the

plasmid playing an active part in this process. The loss of the prophage makes cells unable to dissociate.

At the basis of the data obtained, the formal scheme of dissociative transition of *R. rubropertinctus* is proposed.

Таблица 1.

Некоторые свойства недиссоциирующих клонов S-варианта *Rhodococcus rubropertinctus* после лизогенизации
 (1э - исходный клон S-варианта, получен после обработки клеток бромистым этидием;
 7а - исходный клон S-варианта, получен после обработки клеток акридиновым оранжевым;
 S1э, S7а - контроль клонов: без лизогенизации.)

Исходный клон S-варианта	Клон после лизогенизации	Чувствительность к фагу: титр фага, ед/мл	Спонтанное выделение фага: титр фага, ед/мл	Соотношение вариантов, %		
				R	S	M
1э (получен после обработки клеток бромистым этидием)	S1э (контроль, без лизогенизации)	$8 \cdot 10^3$	0	0	100	0
1э	S1э-1	$3 \cdot 10^3$	0	0	100	0
1э	S1э-2	$8 \cdot 10^2$	0	0	100	0
1э	S1э-3	$1 \cdot 10^3$	0	0	100	0
1э	S1э-4	0	10^6	0,1	99,5	0,4
1э	S1э-5	$2 \cdot 10^3$	0	0	100	0
1э	S1э-6	$9 \cdot 10^2$	0	0	100	0
1э	S1э-7	$1 \cdot 10^3$	0	0	100	0
7а (получен после обработки клеток акридиновым оранжевым)	S7а (контроль, без лизогенизации)	$8 \cdot 10^3$	0	0	100	0
7а	S7а-1	$4 \cdot 10^3$	0	0	100	0
7а	S7а-2	$7 \cdot 10^3$	0	0	100	0
7а	S7а-3	0	10^5	0,2	99,3	0,5
7а	S7а-4	$2 \cdot 10^3$	0	0	100	0
7а	S7а-5	$9 \cdot 10^2$	0	0	100	0
7а	S7а-6	$1 \cdot 10^3$	0	0	100	0
7а	S7а-7	$2 \cdot 10^3$	0	0	100	0
Индикаторная культура		$2 \cdot 10^9$				

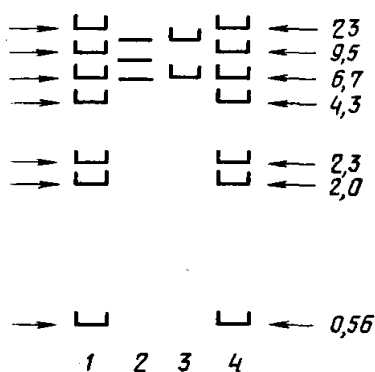


Рис. 1. Схема электрофо-реграммы разделения фрагментов ДНК плазмиды из S-варианта *Rhodococcus rubropertinctus*, обработанной разными рестриктаза-ми, в 0,7%-м геле агарозы: 1.4 — маркер, 2 — рест-ри.ктаза *Cfr* 13 I, 3 — рестриктаза *Msp* I. В качестве маркера при определении размеров рестрик-ционных фрагментов использовали ДНК фага X, обработанную рестриктазой *Hind* III. Стрелками обозначены положения маркерных ДНК; числа у стрелок — размеры указанных фрагментов, тыс. пар нук-леотидов

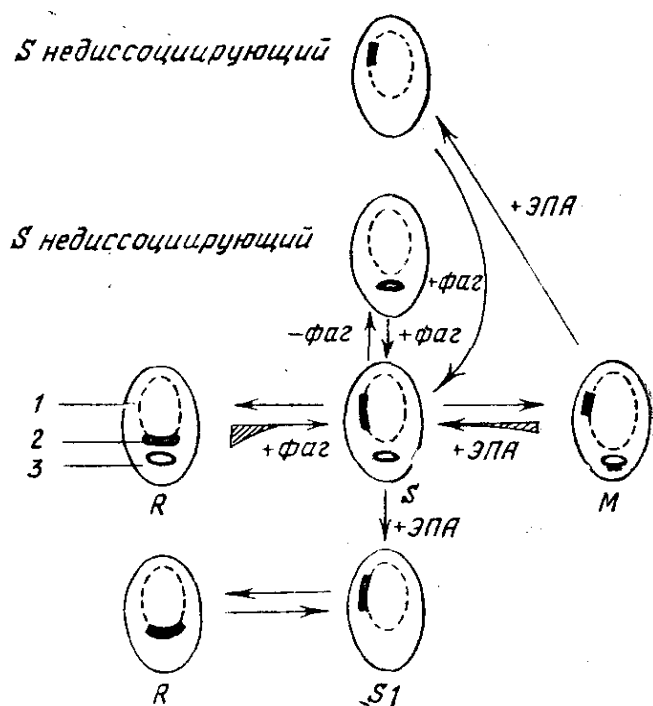


Рис. 2. Схема взаимных переходов клонов диссоциантов *Rhodococcus rubro-perctincfus*: 1—3 — ДНК (1 — хромосомы, 2 — профага, 3 — плазмиды), ЭПА — элиминирующие плазмиды агенты.