

Т. П. Перерва, Н. Ю. Мирюта, А. Ю. Мирюта,

ЛИЗОГЕНИЯ У ФАГА MS2.

СИНТЕЗ ФАГОСПЕЦИФИЧНОЙ РНК НА КЛЕТОЧНОЙ ДНК

При помощи нереплицирующегося Ар-фрагмента создана клонотека EcoRI-фрагментов ДНК MS2-индуцированного лизирующего мутанта Escherichia coli AB259 Hfr3000. Тотальная РНК, выделенная из плазмидосодержащих клеток, гибридизована с ДНК рMS27, содержащей ДНК-копию РНК фага MS2, и с частью этой ДНК-копии, свободной от векторной последовательности. Полученные результаты свидетельствуют о считывании фагоспецифичной РНК с хромосомной ДНК E. coli AB259 Hfr3000, проклонированной в составе гибридной плазмиды.

Введение. Благодаря своей популярности в качестве модели при исследовании тонких механизмов трансляции РНК-содержащие фаги представляют собой один из наиболее полно изученных объектов. В то же время интереснейшие особенности их биологии — эволюционная и функциональная связь с F-фактором чувствительной клетки, а также проблема лизогении у этой группы фагов — остаются областью, практически неизученной. Если кодирование F-фактором половых фимбрий, обеспечивающих все стадии заражения чувствительной клетки донорспецифичными фагами, видится достаточно понятным, то возможное влияние РНК-содержащих фагов на половой фактор в процессе инфекции остается предметом единичных экспериментальных работ [1—3]. Что касается лизогении у РНК-содержащих фагов, то в пользу ее возможности косвенно свидетельствует настораживающе легкое приобретение устойчивости к этим фагам клетками зараженной фагочувствительной популяции в условиях, препятствующих быстрому клеточному делению. К сожалению, вопрос лизогении у РНК-содержащих фагов трудно разрешим классическими тестами: особенности инфекционного цикла и наличие у РНК-содержащих фагов состояния носительства затрудняют интерпретацию опытов, где наблюдалась секреция фага зараженной бактериальной культурой; с другой стороны, спонтанные мутации в F-факторе способны привести клетку в состояние устойчивости к донорспецифичным фагам, что ограничивает возможности теста на иммунитет, обусловленную лизогенией.

Несмотря на это, в одной из предшествующих работ [4] нам удалось показать, что примерно 1,3 % потомков инфицированной бактерии *Escherichia coli* AB259 Hfr3000 приобретают MS2-устойчивость, не связанную с селекцией предшествующих F-клеток. Впоследствии оказалось, что индуцированные фагом мутанты не являются окончательной формой изменения и выщепляют новые типы мутантов — несколько промежуточных и два конечных [5]. Процесс выщепления сопровождается усугублением мутаций в F-факторе — от неспособности F-фимбрий обеспечить фаговую адсорбцию до полного их исчезновения.

Клетки одного из конечных мутантов, будучи устойчивыми к заражению интактным фагом, характеризуются проницаемостью для нуклеиновых кислот за счет дефектов клеточной стенки [6]. На сплошном газоне таких клеток клетки второго конечного мутанта, названного нами лизирующим, формируют колонии, окруженные зоной лизиса. На газоне клеток дикого типа они растут как отдельные колонии, но без зоны лизиса. Препарат суммарной РНК, выделенной из лизирующих клеток фенольно-детергентным методом, при высеве на чувствительный газон вызывает образование прозрачных негативных колоний. Количество плоскообразующих единиц, содержащихся в этих колониях, колеблется от 25 до 280. Эти наблюдения позволяют предположить, что литическое начало представлено или некой формой фаговой РНК, например, рибонуклеопротеидным комплексом, или очень неустойчивыми дефектными частицами фага. Однако присутствие в мутантной клетке

подобных структур не является свидетельством истинно лизогенного состояния как встраивания фагового генома в клеточную хромосому, поскольку не исключает вероятности персистентной инфекции, обусловленной происхождением мутантов.

Помимо персистенции существует еще одно серьезное возражение по поводу возможности лизогении у РНК-содержащих фагов. Оно заключается в отсутствии гомологии между фаговой РНК и ДНК чувствительной клетки, которую не удалось установить методами, достаточно тонкими для обнаружения гибридов, даже если бы ДНК содержала комплементарные РНК-последовательности в количестве, эквивалентном 1/10 молекулы фаговой РНК на один ДНК-геном [7].

Однако, располагая коллекцией полученных нами MS2-индуцированных мутантов с весьма необычными свойствами, мы попытались выяснить, не обусловлены ли эти свойства структурной связью фагового генома с клеточной хромосомой. Выявление такой связи могло бы пролить свет на труднообъяснимые стороны взаимодействия РНК-содержащих фагов с клеткой-хозяином и явиться доказательством способности фага MS2 устанавливать истинную лизогению как состояние, основанное на физическом объединении фагового генома с клеточной ДНК.

В настоящей работе произведено клонирование *EcoRI*-фрагментов ДНК хромосомы MS2-индуцированного лизирующего мутанта кишечной палочки и показан синтез MS2-специфической РНК в клетках трансформированных рекомбинантными плазмидами.

Материалы и методы. Бактерии *E. coli* AB259 Hfr3000 (*E. coli* 3000) получены из Ин-та молекуляр. биологии РАН; *E. coli* HB101 — из Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Проницаемый и лизирующий мутант *E. coli* 3000 выделены нами самостоятельно как сегреганты MS2-индуцированного первично устойчивого мутанта [4, 5].

Плазмиды. Штамм, содержащий плазмиду *pCV16* [8], передан нам из Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов РАН; штамм, включающий плазмиду *pMS27* [8—10], предоставлен д-ром Р. Девосом (Кентский ун-т, Бельгия).

Фаги. Фаг MS2 получен из Ин-та молекуляр. биологии РАН.

Питательные среды. Использовали аминокислотный агар (АПА), 1,2 и 0,6 %, а также аминокислотный бульон (АПБ).

Всю работу проводили с фагом по [11].

Чувствительность к фагу и литической активности, содержащейся в мутантных и плазмидных культурах, исследовали методом спот-теста: клетки дикого типа *E. coli* 3000 или ее проницаемого мутанта высевали сплошным слоем на поверхность плотной питательной среды и петлей наносили сверху маленькую каплю исследуемого материала (фаг или бактериальную взвесь). Через сутки роста на чувствительной культуре появлялось четкое пятно или кольцевая зона лизиса, отсутствующие при нанесении материала на устойчивую культуру.

Выделение РНК из фага MS2 и хромосомной ДНК из бактерий, получение плазмид, клонирование, рестрикционный анализ и блот-гибридизацию проводили по [12]; выделение суммарной РНК из бактерий — литиевым методом по [13], физическое картирование плазмид осуществляли методом совместных и одиночных переваров [14].

Результаты и обсуждение. Получение рекомбинантных плазмид с литическими свойствами мутанта лизирующего типа. Поскольку мутации, определяющие биологические свойства мутанта лизирующего типа, связаны с областью инициации репликации встроенного в хромосому *F*-фактора [5], клонирование интересующего нас участка клеточной ДНК проводили с использованием нереплицирующего *Ap*-фрагмента плазмиды *pCV16*, несущего ген устойчивости к ампициллину. Хромосомную ДНК мутанта, обработанную рестриктазой *EcoRI*, лигировали с изолированным *Ap*-фрагментом, вырезанным из плазмиды при помощи этого же фермента, и лигированной смесью трансформировали реципиентные клетки

E. coli HB101. Первично клоны отбирали по устойчивости к ампициллину. Теоретически полученная таким методом клонотека содержала плазмиды, включающие в себя области инициации репликации клеточной хромосомы или интегрированного с ней F-фактора. Дальнейшая задача состояла в отборе клонов, способных продуцировать литическую активность того же типа, что и исходный лизирующий мутант. Для этой цели мы использовали клетки проницаемого мутанта, при высеве на которые лизирующий мутант образует колонии, окруженные зоной лизиса.

Отобранные по устойчивости к ампициллину клоны отсеивали в отдельные пробирки в АПБ и выращивали первые сутки при 37 °С, а затем несколько суток при комнатной температуре. Для проверки лити-

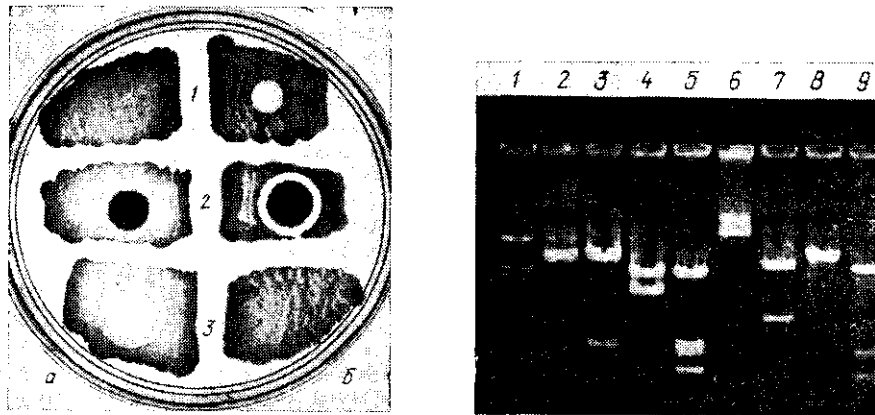


Рис. 1. Литические свойства плазмидосодержащей культуры, лизирующего мутанта и фага MS2 на стандартном для РНК-содержащих фагов хозяине *E. coli* 3000 и его проницаемом мутанте: а — газон клеток *E. coli* 3000; б — газон клеток проницаемого мутанта (1 — капля бульонной культуры, содержащей плазмиду *pL26*; 2 — капля бульонной культуры лизирующего мутанта; 3 — капля суспензии фага MS2)

Рис. 2. Электрофореграммы ДНК плазмид *pL26* и *pCV16*, обработанных эндонуклеазами рестрикции: 1 — ДНК λ , обработанная *HindIII* и *EcoRI* (маркер); 2 — ДНК *pL26*; 3 — ДНК *pL26*, обработанная *EcoRI*; 4 — ДНК *pL26*, обработанная *PstI*; 5 — ДНК *pL26*, обработанная *PstI* и *EcoRI*; 6 — ДНК *pCV16*; 7 — ДНК *pCV16*, обработанная *EcoRI*; 8 — ДНК *pCV16*, обработанная *PstI*; 9 — ДНК *pCV16*, обработанная *PstI* и *EcoRI*

ческих свойств отобранных культур материал из каждой пробирки наносили петлей на свежевысеянный газон клеток проницаемого мутанта. Оказалось, что значительная часть всех Ар-устойчивых клонов (около одной трети) способна в течение нескольких суток накапливать литическую активность и при нанесении на тест-газон образовывать или пятно, или зону лизиса вокруг зоны клеточного роста. Способность к накоплению литической активности у разных клонов была неодинаковой — у одних это происходило быстро и сопровождалось медленным ростом клеток и скорым их отмиранием, у других накопление литического начала шло медленно, бактериальная суспензия мутнела с обычной для кишечной палочки скоростью и отмирание клеток не отличалось интенсивностью. При работе с плазмидами первого типа наблюдались определенные трудности — низкий выход при выделении и слабоэффективная трансформация. Плазмиды второго типа легко выделялись стандартными методами, эффективно трансформировали *E. coli* HB101 и при каждой повторной трансформации позволяли получать бактериальные культуры со свойствами первично трансформированного клона. В настоящей работе использована плаزمида *pL26*, относящаяся ко второму типу. Литические свойства описываемой нами экспериментальной системы наследуются стабильно и выглядят очень четко (рис. 1).

Как можно судить по данным рис. 1, литические свойства, а именно: специфичность к определенному хозяину плазмидосодержащего клона совпадают с таковыми исходного лизирующего мутанта и отличаются от подобных свойств фага MS2. Неспособность фага MS2 лизировать проницаемый мутант объясняется отсутствием у мутантных клеток *F*-фимбрий. Таким образом, биологические характеристики ре-

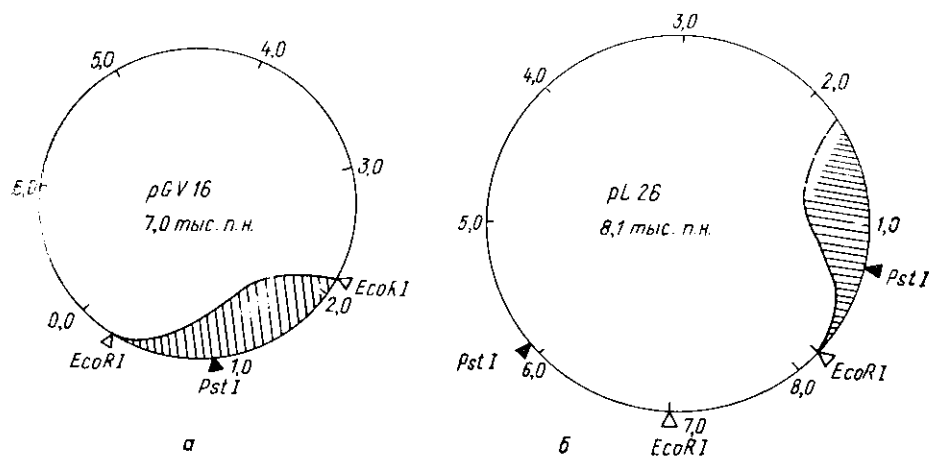


Рис. 3. Физические карты плазмид по *PstI* и *EcoRI*: 1 — *pCV16* [8]; 2 — *pL26*. Заштрихованная часть — фрагмент, содержащий ген устойчивости к ампициллину

комбинантных плазмид позволяют считать, что нам удалось проклонировать область хромосомы, определяющую фенотип ранее описанного лизирующего мутанта *E. coli* 3000.

Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды *pL26*. Результаты рестрикционного анализа рекомбинантной плазмиды *pL26* в сравнении с векторной плазмидой *pCV16* показаны на рис. 2.

Как видно из этого рисунка, нерестрицированная рекомбинантная плазида выглядит стандартным образом. При обработке *pCV16* и *pL26* *EcoRI* оказалось, что фрагмент *pCV16* размером 1,7 тыс. п. н., содержащий ген устойчивости к ампициллину, не совпадает по размеру ни с одним из двух *EcoRI*-фрагментов *pL26*. Физическая карта *pL26*, построенная методом одиночных и совместных переваров эндонуклеазами рестрикции [14] *EcoRI* и *PstI*, приведена на рис. 3 вместе с картой *pCV16*, представленной в работе [8]. Как видно из сравнения физических карт *pCV16* и *pL26*, фрагмент *pCV16* с геном устойчивости к ампициллину размером 1,7 тыс. п. н. претерпел изменения при образовании плазмиды *pL26*. Можно предположить, что он утратил либо фрагмент величиной 0,5 тыс. п. н., содержащий *PstI*-сайт, либо фрагмент, включающий *EcoRI*-сайт (правый). Второй вариант более вероятен, так как утрата *PstI*-сайта, находящегося в середине фрагмента гена устойчивости к ампициллину, привела бы к нарушению работы этого гена в отличие от утраты *EcoRI*-сайта в концевой части этого фрагмента. Согласно физической карте рекомбинантной плазмиды *pL26*, более мелкий *EcoRI*-фрагмент размером 1,2 тыс. п. н. не имеет отношения к *Ap*-фрагменту, точные размеры которого при помощи рестриктаз *EcoRI* и *PstI* определить не удалось.

Определение присутствия MS2-специфичной РНК в плазмидосодержащих клетках. Присутствие MS2-специфической РНК в клетках, содержащих плазмиду *pL26*, определяли методом блот-гибридизации. Все препараты суммарной клеточной РНК, подвергнутые блот-гибридизации, проанализированы предварительно электрофорезом в агарозном геле с 6 М мочевиной. Результаты электрофореза показаны на рис. 4. Данные электрофореграммы свидетельствуют о том, что и РНК MS2, и суммарная РНК, выделенная из раз-

личных бактериальных культур, соответствуют ожидаемым параметрам.

Блот-гибридизацию изучаемых препаратов РНК осуществляли с использованием различных зондов. На рис. 5 показаны результаты гибри- ридизации РНК с ^{32}P -ДНК плазмид *pL26* и *pCV16*. Плазмида *pL26* выбрана нами в связи с тем, что в клетках, ее содержащих, накапли- валась литическая активность. Представляло интерес выяснить, содер-

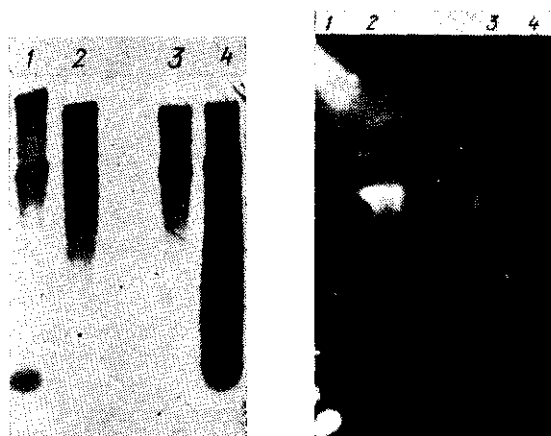


Рис. 4. Электрофорезграмма суммарных РНК в агарозном геле с 6 М мочевиной: 1 — рибосомная 28S и 18S РНК (маркер); 2 — РНК MS2; 3 — РНК *pL26*-содержащих кле- ток; 4 — РНК *E. coli* 3000

Рис. 5. Радиоавтограф блот-гибридизации ^{32}P -ДНК *pL26* с суммарной РНК: 1 — MS2; 2 — РНК из *pL26*-содержащих клеток; 3, 4 — РНК *E. coli* 3000. Гибридизации ^{32}P -ДНК *pCV16* с этими препаратами РНК не обнаружено

жит ли *pL26* последовательность, комплементарную РНК MS2. Плазм- иду *pCV16* использовали в качестве контроля.

Как видно из результатов этого опыта, ДНК плазмиды *pL26* гиб- ридизуется с РНК *pL26*-содержащей культуры, а также с РНК-кон- трольного штамма *E. coli* 3000. С РНК фага MS2 гибридизация от- сутствует, так же как она отсутст- вует со всеми образцами РНК при использовании в качестве зонда плазмиды *pCV16*. Гибридизацию ДНК *pL26* с РНК контрольной культуры можно объяснить тем, что в *pL26* включился участок хромо- сомы мутанта *E. coli* 3000, и гибриди- зация осуществляется с клеточной РНК, гомологичной одному и тому же фрагменту плазмидной ДНК.



Рис. 6. Радиоавтограф блот-гибридизации ^{32}P -ДНК *pMS27* (а) и ^{32}P -ДНК фрагмента *pMS27*, содержащего часть кДНК РНК фа- га MS2 (б), с суммарной РНК: 1 — РНК MS2; 2 — РНК *pL26*-содержащих клеток; 3 — РНК *E. coli* 3000

Отсутствие гибридизации *pL26* с РНК фага MS2 побудило нас к использованию в качестве зонда плазмиды *pMS27*, содержащей ДНК- копию РНК MS2, и *EcoRI*-фрагмента этой копии, содержащего только MS2-специфичную последовательность, свободную от векторной части. Результаты гибридизации показаны на рис. 6. Полученные данные сви-

детельствуют о наличии гибридизации РНК MS2 и суммарной РНК *pL26*-содержащих клеток как с зондовой плазмидой *pMS27*, так и с отдельным фрагментом, содержащим часть ДНК-копии РНК фага MS2, свободную от векторной последовательности. Расположение сигналов совпадает и отличается только интенсивностью. Гибридизация с РНК контрольного штамма *E. coli* 3000 отсутствует, что указывает на специфичность связывания ДНК обоих зондов с РНК фага MS2 и РНК *pL26*-содержащих клеток.

Таким образом, выполненные в настоящей работе исследования приводят к двум основным выводам: 1) в клетках, несущих плазмиду *pL26*, включившую часть хромосомы описанного ранее MS2-индуцированного лизирующего мутанта *E. coli* AB259 Hg3000, накапливается MS2-специфическая РНК; 2) ДНК плазмиды *pL26* с РНК фага MS2 не гибридизуется.

Из этого следует, что генетический материал РНК-содержащего фага MS2 может вступать в прочную структурную связь с хромосомной ДНК Hg-штамма *E. coli*, что соответствует классическому представлению об основах фаговой лизогении. В то же время отсутствие гибридизации плазмидной ДНК с РНК MS2 позволяет предположить, что плазида содержит или плюс-цепочку РНК-подобной ДНК, или же саму фаговую РНК. Возможно, что протяженность фагоспецифичного генетического материала, включенного в состав клеточной и соответственно плазмидной ДНК, короче нативной фаговой РНК, о чем можно судить по расположению положительных сигналов (см. рис. 6), а также по отсутствию жизнеспособного фага как в клетках лизирующего мутанта, так и в клетках плазмидосодержащих культур.

Авторы выражают глубокую благодарность Т. С. Даниленко за выделение общей клеточной РНК из *E. coli* 3000 и *pL26*-содержащих клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Widmer H. R., Lebec G. Der Einfluss von RNS-Phagen und Konjugationsfaktoren // Pathol. et Microbiol.— 1974.— 40, N 3—4.— S. 153—154.
2. Widmer H. R., Lebec G. Weitere Ergebnisse zur Wechselwirkung zwischen RNS-Phagen und R-Faktoren // Ibid.— 41, N 3—4.— S. 194—195.
3. Zgaga V. Lysogeny by F2 phage? // Nature.— 1977.— 267, N 5614.— P. 860—861.
4. Перерва Т. П. Устойчивость к фагу MS2, индуцированная у *E. coli* при заражении этим фагом // Цитология и генетика.— 1977.— 11, № 1.— С. 3—9.
5. Перерва Т. П., Малюта С. С. Система MS2-индуцированных мутантов *E. coli* по F-фактору // Молекуляр. биология.— 1984.— 38.— С. 81—90.
6. Перерва Т. П., Бух И. Г., Даниленко Т. С. Изучение проницаемости MS2-индуцированных мутантов *E. coli* для нуклеиновых кислот // Вирусы и вирус. заболевания.— 1985.— 13.— С. 22—26.
7. Спигелман С. Внеклеточная стратегия реплицирующегося РНК-генома // Стратегия вирус. генома.— М.: Медицина, 1975.— С. 45—67.
8. Копылова-Свиридова Т. Н., Фодор И., Баев А. А. Новые векторные плазмиды для селекции рекомбинантных клонов *E. coli* // Докл. АН СССР.— 1979.— 245, № 5.— С. 1250—1253.
9. Devos R., Van Emmelo J., Contreras R., Fiers W. Construction and characterization of a plasmid containing a nearly full-size DNA copy of bacteriophage MS2 RNA // J. Mol. Biol.— 1979.— 128, N 4.— P. 595—619.
10. Devos R., Contreras R., Van Emmelo J., Fiers W. Identification of the translocatable element IS1 in a molecular chimera constructed with plasmid *pBR322* DNA into which a bacteriophage MS2 copy was inserted by the poly(dA) poly(dt) linker method // Ibid.— P. 621—632.
11. Адамс М. Бактериофаги.— М.: Изд-во иностр. лит., 1961.— 527 с.
12. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
13. Chirguin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease // Biochemistry.— 1979.— 18, N 24.— P. 5294—5298.
14. Fitch W. M., Smith T. F., Ralph W. W. Mapping the order of DNA restriction fragments // Gene.— 1983.— 22, N 1.— P. 19—29.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 06.08.92