

## Использование бактериофага F44 для поиска внегенных супрессоров у *Erwinia horticola*

Товкач Ф. И., Горб Т. Е.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Из *E. horticola* выделен фаг F44 с широким спектром бактерий-хозяев. С помощью гидроксиламина получали его nonsense-мутанты, которые отбирали на штаммах *Escherichia coli* со строго определенным внегенным супрессором (*supE44/su2<sup>+</sup>*). Из ауксотрофных мутантов *E. horticola* *His<sup>-</sup>* (полученных с помощью 2-аминопурина и гидроксиламина) изолировали спонтанные ревертанты *His<sup>+</sup>*. Супрессорные штаммы этой бактерии отбирали по чувствительности ревертантов *His<sup>+</sup>* к фагу F44 и его nonsense-мутантам. Использование фага F44 в качестве тест-системы для поиска внегенных супрессоров у *E. horticola* является достаточно эффективным для таких малоизученных бактерий, как *Erwinia*.

**Введение.** Ранее нами обнаружены три умеренных эрвиниофага (49, 59 и E105), индикаторными культурами для которых являются некоторые штаммы *E. horticola* [1]. Для фага 59 построена физическая [2] и генетическая карты *ts*- и *clear*-мутаций [3, 4]. Однако для согласования этих результатов и изучения функциональной характеристики генов необходимо иметь генетическую карту nonsense-мутантов этого бактериофага, что требует наличия супрессорных мутантов чувствительных бактерий. К настоящему времени вопрос о внегенной супрессии у бактерий рода *Erwinia* является малоизученным [5], тогда как использование супрессоров у *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* сыграло ключевую роль в исследовании молекулярной генетики этих бактерий и их бактериофагов [6, 7]. Недавно нами описаны фаги с широким кругом хозяев, способные репродуцироваться на бактериях рода *Erwinia* и на многих штаммах *E. coli* [8]. Целью данной работы было применение одного из таких фагов (F44) для поиска внегенных супрессоров у *E. horticola* 450.

**Материалы и методы.** В работе использовали традиционные для эрвиниофагов 49, 59 и E105 индикаторные культуры *E. horticola* 60 и 450 [9]. Для дополнительных исследований были взяты также другие штаммы этих бактерий (305, 43 I, 120 и 23а) из коллекции отдела фитопатогенных

бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины. В некоторых экспериментах применяли штаммы *E. herbicola* EH103 и g157, а также *E. chrysanthemi* 910 и ENA 49, предоставленные Ю. К. Фомичевым (Белорусский государственный университет) и штаммы псевдомонад (*P. putida* 4126 — ATCC12633, *P. fluorescens* 4125 — ATCC13525, *P. aeruginosa* 4000 — ATCC 10145), полученные от С. М. Столяра (Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины). Штаммы *E. coli* BE, gA120, а также фаг T2 предоставлены И. И. Серышевой (Институт биохимии РАН). Штамм *E. coli* L1<sup>+</sup> получен от Л. С. Чернина (Институт химической физики РАН), штаммы NB101 и TG1 — от Н. А. Козыровской (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины).

Бактерии и бактериофаги изучали на основе классических методов [10]. Ауксотрофные мутанты по гистидину (*His<sup>-</sup>*) и мутанты, дефектные по сбраживанию лактозы (*Lac<sup>-</sup>*), *E. horticola* 450 получали с помощью 2-аминопуридиннитрата (2-АП) и гидроксиламина (ГА), которые использовали в концентрациях 600 мкг/мл и 1 моль/л соответственно. Для получения nonsense-мутантов бактериофагов 59 и F44 применяли ГА в такой же концентрации. Эффективность мутагенеза оценивали по процентному содержанию *clear*-мутантов в штоке мутагенизированного умеренного фага 59.

Для накопления *His<sup>-</sup>*-мутантов проводили ам-

пициллиновое обогащение по стандартной методике [11]. *Lac*<sup>-</sup>-мутанты после ампициллинового обогащения высевали на твердую среду ЭНДО; после нескольких пересевов на данной среде отбирали мутантные клоны.

Характер мутаций (точечность) был проверен с помощью вынужденных реверсий 2-АП и нитрозогуанидином.

Тест на фенотипическое излечение проводили по методу [12], используя диски с канамицином (330 мкг) и стрептомицином (1500 мкг). Спонтанные ревертанты *His*<sup>-</sup>-клонов *E. horticola* 450 получали только из тех вариантов, которые давали положительную реакцию при фенотипическом излечивании. Ревертанты *Lac*<sup>+</sup> были получены таким же образом, за исключением того, что колонии мутантных клонов (*His*<sup>-</sup> *Lac*<sup>-</sup>) высевали на среду ЭНДО.

Для тестирования супрессорных мутантов использовали дикий штамм *E. horticola* 450 (*su*<sup>-</sup>-фенотип), *E. coli* gA120 (*su*<sup>-</sup>), HB101 (*supE44/su2*<sup>+</sup>) и дикий тип фага F44 с его *nonsense*-мутантами, которые были получены с применением ГА по методу [7].

**Результаты и обсуждение.** В классическом варианте получение бактериальных *nonsense*-мутантов проводят по следующей простой схеме [12]. Вначале получают набор мутантов (обычно ауксотрофных) с помощью мутагенов, вызывающих транзиции типа АТ—ГЦ и ГЦ—АТ (2-аминопуридиннитрат и гидроксилламин); в случае 2-АП происходит избирательное накопление *nonsense*-мутантов за счет образования незначительных количеств мутантов *missense*-типа при транзитивном мутагенезе [12]. После проверки каждого отдельного мутанта на точечный характер мутации с помощью вынужденной реверсии другим мутагеном (нитрозогуанидином) проводят тест на фенотипическое излечение аминогликозидными антибиотиками (канамицин, стрептомицин и неомицин). Обычно положительность такого теста свидетельствует о наличии *nonsense*-мутации и о возможности внегенной супрессии у спонтанных ревертантов. Для более строгого доказательства внегенной супрессии используют двойные *nonsense*-мутанты, которые могут спонтанно ревертировать исключительно за счет этого процесса.

Следуя вышеописанной схеме и используя ампициллиновое обогащение, мы получили 61 точечный ауксотрофный мутант *E. horticola* 450 с помощью 2-АП и ГА, 16 (26 %) из которых проявили положительную реакцию на фенотипическое излечение стрептомицином и канамицином. На рис. 1 представлены результаты по фенотипическому

излечиванию одного из ауксотрофов, полученного ГА-мутагенезом (*His*<sup>-</sup>1).

Поскольку мутации, затрагивающие гены лактозного оперона, являются удобными для генетических исследований в случае представителей энтеробактерий, мы получили 19 различных мутантов *E. horticola* 450 с *Lac*<sup>-</sup>-фенотипом. Однако по неизвестным причинам только два из них были чувствительными к фагу F44 и два других были способны поддерживать репродукцию умеренного фага 59. Ввиду этого мутанты *Lac*<sup>-</sup> были исключены из последующих исследований.

В дальнейшем из ауксотрофных мутантов *His*<sup>-</sup>1 и *His*<sup>-</sup>2 (ГА-мутагенез), а также *His*<sup>-</sup>11 и *His*<sup>-</sup>15 (2-АП-мутагенез) с положительным ответом на фенотипическое излечение получали спонтанные ревертанты — фенотип *His*<sup>+</sup>. Частота спонтанных реверсий во всех четырех вариантах находилась в пределах  $(0,5—2,0) \cdot 10^{-8}$ . Поскольку в нашем случае не представлялось возможным проверить факт наличия внегенной супрессии с помощью двойных ревертантов, а также с помощью экстрахромосом, несущих известные *nonsense*-мутации [13], для проверки полученных ревертантов *His*<sup>+</sup> использовали фаг F44.

Вирулентный бактериофаг F44 получен методом фаг-фаговой индукции при титровании фага

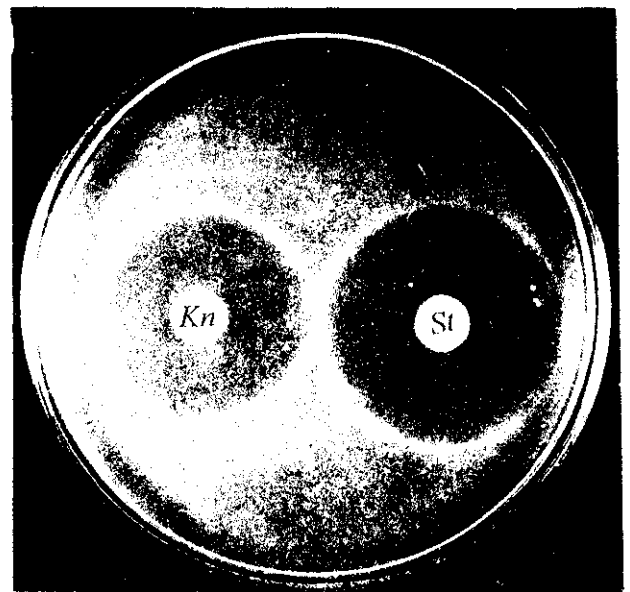


Рис. 1. Канамициновая (Kn) и стрептомициновая (St) супрессия *nonsense*-мутанта *His*<sup>-</sup>1 *E. horticola* 450. Фенотипическое излечение мутанта происходит преимущественно в периферических участках зон лизиса

T2 на штамме *E. horticola* 60 [8]. В серии независимых исследований было установлено, что этот фаг относится к морфотипу C1 и подобно колифагу T7 имеет широкий круг бактерий-хозяев. В отличие от фага T7 фаг F44 одинаково эффективно размножается на бактериях родов *Erwinia* и *Pseudomonas* и на лабораторных штаммах *E. coli*, включая и те из них, которые несут половой фактор F, тогда как известные эрвиниофаги 49, 59 и E105 [9] могут репродуцироваться только на определенных штаммах *E. horticola*, но не на *E. coli* (табл. 1). На бактериальных газонах фаг F44 образует четкие негативные колонии, размер которых достигает 4 мм (рис. 2), что является немало важным для генетических исследований.

Пользуясь названными свойствами фага F44, получали его *nonsense*-мутанты с помощью штаммов *E. coli* gA120 (*su<sup>-</sup>*) и HB101 (*supE44/su2<sup>+</sup>*). Для этого шток фага после мутагенеза гидроксиламином (выживаемость 0,05 %) высевали до отдельных колоний на *E. coli* HB101. Несколько тысяч фаговых клонов испытывали на способность давать негативные колонии на штаммах *E. coli* gA120 и HB101; те из них, которые титровались на пермиссивном, но не проявляли активности по отношению к непермиссивному хозяину, рассматривались как имеющие *nonsense*-фенотип. 40 таких фаговых мутантов очищали реклонированием на HB101 и проверяли их способность давать рекомбинантное потомство при попарном скрещивании на непермис-

Таблица 1  
Эффективность посева бактериофагов на клетках *Erwinia*, *Pseudomonas* и *E. coli* при 25 °С

Род, вид, штамм	Бактериофаг				
	T7	F44	49	59	E105
<i>E. horticola</i> :					
60	0	1,0	1,0	1,0	1,0
450	0	1,0	1,0	1,0	0
305	0	1,0	0	1,0	1,0
43 I	0	0	1,0	0	0
120	0	$1 \cdot 10^{-5}$	0	0	0
23a	0	0	0	0	0
<i>E. herbicola</i> :					
EH103	0	0,3	0	0	0,1
g157	0	0	0	0	0
<i>E. chrysanthemi</i> :					
910	0	$4 \cdot 10^{-3}$	0	0	0
ENA 49	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> :					
<i>putida</i> 4126	0	0,2	0	0	0
<i>putida</i> BS228	0	0,3	0	0	0
<i>fluorescens</i> 4125	0	0	0	0	0
<i>aeruginosa</i> 4000	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> :					
BE	1,0	$1 \cdot 10^{-2}$	0	0	0
LI <sup>+</sup>	1,0	$1 \cdot 10^{-4}$	0	0	0
HB101	1,0	1,0	0	0	0
gA120	1,0	0,6	0	0	0
TG1 (Hfr)	$> 10^{-6}$	0,8	0	0	0

\*Эффективность посева фага F44 на *E. coli* при 37 °С в среднем в 2 раза ниже, чем при 25 °С.

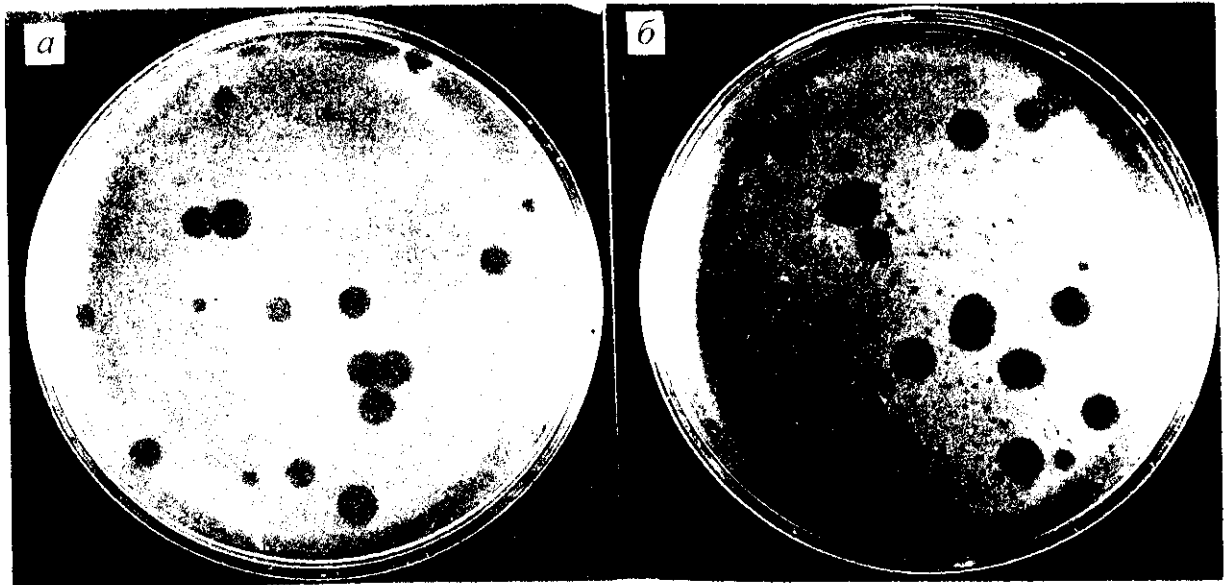


Рис. 2. Негативные колонии, образуемые бактериофагом F44 на *E. horticola* 450 (а) и *E. coli* HB101 (б). На газон клеток штамма HB101 фаг F44 посеян совместно с фагом T2

Таблица 2  
Чувствительность  $His^+$ -ревертантов *E. horticola* 450 к фагам

Штамм	Количество ревертантов ( $His^+$ )	Чувствительность к фагам					
		F44	F44, ам4	F44, ам5	F44, ам7	F44, ам8	59
<i>E. coli</i>							
gA120 ( $su^-$ )		+	-	-	-	-	-
HB101 ( $su^+$ )		+	+	+	+	+	-
<i>E. horticola</i>							
450 ( $su^-$ )		+	-	-	-	-	+
$His^-1$	7	7	5	2	-	3	7
$His^-2$	29	29	10	11	9	11	29
$His^-11$	42	42	35	11	14	15	42
$His^-15$	1	1	1	-	1	-	1

\*Цифры обозначают количество чувствительных штаммов.

сивных клетках — gA120. В результате такой проверки для последующих исследований были отобраны четыре мутанта. Учитывая, что такие мутанты получены на штамме со строго определенным внегенным супрессором (*supE44*) и образованием фаговых *amber*-мутантов в этом случае наиболее вероятно [7], данные мутанты фага F44 рассматривались нами как принадлежащие к *amber*-типу.

В дальнейшем методом негативных пятен проверяли наличие репродукции *amber*-мутантов наряду с аутентичным фагом F44 и фагом 59 на *E. horticola* 450 и полученных  $His^+$ -ревертантах (табл. 2).

Результаты, представленные в табл. 2, указывают на внегенную супрессию у большинства ревертантов; отсутствие чувствительности некоторых

из них к определенным *amber*-мутантам фага F44 можно объяснить наличием различных супрессоров (*ochre*- и *opal*-типа). Они свидетельствуют также о разной эффективности супрессии у *His*<sup>+</sup>-ревертантов *E. horticola* 450. Проверка эффективности посева *amber*-мутантов и исходного фага F44 на *E. coli* gA120 (*su*<sup>-</sup>) и HB101 (*su*<sup>+</sup>), *E. horticola* 450 (*su*<sup>-</sup>) и на некоторых *His*<sup>+</sup>-ревертантах (*su*<sup>+</sup>) показала, что у этой бактерии может существовать не менее двух классов внегенных супрессоров; при этом максимальная эффективность супрессии может достигать 50 %.

В следующей серии экспериментов аналогично фагу F44 были получены *nonsense*-мутанты умеренного бактериофага 59 с использованием в качестве непермиссивного хозяина *E. horticola* 450 и пермиссивного — *E. horticola* 450 *His*<sup>+</sup>1—5 (*su*<sup>+</sup>). С помощью данной системы подтверждено наличие внегенной супрессии и созданы предпосылки для последующего генетического картирования эрвиниофага 59.

Таким образом, использование фага F44 в качестве тест-системы для поиска внегенных супрессоров у *E. horticola* является достаточно эффективным и пока единственно возможным для этого вида бактерий. Кроме того, учитывая широкий спектр литического действия фага F44, апробированная нами система может быть применена для других генетически малоизученных бактерий, в частности, родов *Erwinia* и *Pseudomonas*.

Авторы выражают благодарность М. В. Яговдик за техническую помощь.

Данная работа финансировалась из Государственного фонда фундаментальных исследований Миннауки Украины (проект 5.4/431).

Ф. И. Товкач, Т. Ю. Горб

Використання бактеріофага F44 для пошуку позагенних супресорів у *Erwinia horticola*

Резюме

Раніше з *E. horticola* було виділено фаз F44 з широким колом бактерій-господарів. За допомогою гідроксиламіну отримано його *nonsense*-мутанти, які відбирали на штаммах *Escherichia coli* з чітко визначеним позагенним супресором (*supE44/su2*<sup>+</sup>). З ауксотрофних мутантів *E. horticola His*<sup>+</sup> (одержаних за допомогою 2-амінопурину та гідроксиламіну) ізолювали спонтанні ревертанти *His*<sup>+</sup>. Відбір супресорних штамів цієї бактерії здійснювали за чутливістю ревертантів *His*<sup>+</sup> до фага F44 та його *nonsense*-мутантів. Використання фага F44 як тест-системи для пошуку позагенних супресорів у *E. horticola* є достатньо ефективним для таких маловивчених бактерій, як *Erwinia*.

F. I. Tovkach, T. E. Gorb

Use of the bacteriophage F44 for the search of the *Erwinia horticola* external suppressors

Summary

Earlier we have separated from *E. horticola* the phage F44 which has the wide area of the host bacteria. The hydroxylamine has been used to obtain the F44 nonsense mutants. The selection of F44 nonsense mutants has been carried out on *Escherichia coli* having the definite suppressor (*supE44/su2*<sup>+</sup>). We have isolated spontaneous revertants *His*<sup>+</sup> from the auxotrophic mutants of the *E. horticola His*<sup>-</sup> which have been obtained by the treatment of 2-aminopurine and hydroxylamine. The selection of the *E. horticola* suppressor strains has been based on the sensitivity of the revertants to the F44 and to its nonsense mutants. We have concluded that the use of the F44 as the test system for the search of the *E. horticola* external suppressors is sufficiently effective for such poorly investigated bacteria as *Erwinia*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Кишко Я. Г. Полилизогения *Erwinia carotovora* 268 R // Микробиол. журн.—1984.—46, № 3.—С. 71—76.
2. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Данилейченко В. В., Кишко Я. Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1988.—№ 1.—С. 20—24.
3. Яговдик М. В., Муквич Н. С., Кишко Я. Г. Количественная комплементация ts-мутантов умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* и генетическая карта его генома // Микробиол. журн.—1988.—50, № 1.—С. 37—42.
4. Дидык О. А., Пилипенко В. Г. Получение и комплементационный анализ *clear*-мутантов фага 59 *E. carotovora* 268 // Микробиол. журн.—1984.—46, № 2.—С. 69—70.
5. Schonejans E., Faelen M., Desnet L., Toussait A. Amber suppressors of *Erwinia chrysanthemi* // Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.—1987.—138A, N 3.—P. 289—296.
6. Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика.—М.: Мир, 1981.—646 с.
7. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий.—М.: Мир, 1984.—176 с.
8. Товкач Ф. И. Новый вирулентный бактериофаг, репродуцирующийся в штаммах *Erwinia horticola* и *Escherichia coli* // Микробиол. журн.—1994.—56, № 5.—С. 107.
9. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Кишко Я. Г. Сравнительная характеристика умеренных фагов *Erwinia carotovora* 268 // Микробиол. журн.—1985.—47, № 1.—С. 59—64.
10. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.
11. Witkin E. M., Sicurella N. A. Pure clones of lactose-negative mutants obtained in *Escherichia coli* after treatment with 5-bromouracil // J. Mol. Biol.—1964.—8.—P. 610—625.
12. Whitfield H. J., Jr., Martin R. G., Ames B. N. Classification of aminotransferase (C gene) mutants in the histidine operon // J. Mol. Biol.—1966.—21, N 2.—P. 335—355.
13. Watson J. M., Holloway B. W. Suppressor mutations in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol.—1976.—125, N 3.—P. 780—786.

УДК 579.842.24:579.253.46  
Поступила в редакцию 12.08.98