

## Стратегия использования бактериофагов как инструмента для отбора различных мутантов в популяции клеток

И. Ю. Славченко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*В обзоре впервые проанализированы и обобщены методологические подходы отбора бактериальных мутантов с использованием фагов. На основании литературных данных и собственного опыта автора представлена стратегия использования бактериофагов как инструмента для селекции из бактериальной популяции измененных клеток, обладающих интересующими исследователя свойствами. Описаны примеры использования различных бактериофагов для отбора мутантов бактерий, относящихся к разным таксономическим группам. Рассмотрены сложности, которые могут иметь место в процессе отбора мутантов, ограничения применения таких методов селекции и способы их преодоления. Обсуждены возможности и перспективы использования фагов для отбора бактерий, несущих мутации в генах как гомо-, так и гетерологичного происхождения. Приведены примеры практического приложения таких методов селекции для решения различных задач как фундаментального, так и прикладного характера.*

---

Мутации — важное биологическое явление и ценный инструмент в генетических и биохимических исследованиях. Анализ мутантных штаммов, у которых нарушены различные этапы сложной цепи биохимических процессов, позволяет вскрывать детали организации генетического и биохимического аппаратов клетки. Поэтому изолирование новых мутантов является первой ступенью к структурно-функциональному анализу белков и представляет большой интерес для фундаментальных исследований. Кроме того, в настоящее время, когда стремительно развивается генно-инженерная биотехнология, позволяющая получать биологически активные вещества, имеющие важное практическое значение, все большую актуальность приобретает селекция из бактериальной популяции мутантов, перспективных для использования в биотехнологических процессах.

Однако большинство мутантов нельзя выявить методами прямого отбора из-за отсутствия у них легкоидентифицируемых фенотипов, и исследователям приходится прибегать к случайному поиску соответствующих особей, что требует проверки большого числа бактериальных колоний. Поэтому

для любой мутации, связанной с потерей генетической функции, требуются такие методы селекции, которые позволили бы на фоне основной массы клеток идентифицировать в популяции измененную особь, частота возникновения которой, как правило, не превышает  $10^{-4}$ .

Для этих целей исследователи используют различные методы молекулярной генетики, к которым по праву можно отнести и методы отбора бактериальных мутантов с использованием фагов.

Взаимодействие фага и клетки представляет собой сложный процесс. Почти на всех этапах развития фага принимают участие те или иные клеточные функции. Фаг эффективно использует бактериальные системы репликации, транскрипции, трансляции. Эта сторона взаимодействия фаг—клетка присуща всем фагам и довольно успешно используется исследователями при отборе бактериальных мутантов для решения задач как фундаментального, так и прикладного характера.

Несмотря на это, до настоящего времени в мировой литературе не представлены работы, в которых были бы осуществлены анализ и обобщение методологических подходов отбора бактериальных мутантов с использованием фагов. Лишь в данной работе на основании литературных данных

и собственного опыта автора впервые будут рассмотрены стратегии использования бактериофагов как инструмента для отбора измененных особей, обладающих интересующими исследователя свойствами.

Основной принцип таких методов селекции заключается в том, что бактериальные мутанты, которые необходимо изолировать, в присутствии фага при определенных условиях отличаются от основной массы клеток новым селективным признаком, благодаря чему их можно отбирать в специально созданных условиях.

В литературе описаны примеры использования различных бактериофагов для селекции мутантов бактерий, относящихся к различным таксономическим группам. Однако большинство работ посвящено селекции мутантов *Escherichia coli* с использованием различных производных бактериофага лямбда, и это в немалой степени способствовало тому, что и *E. coli*, и фаг  $\lambda$  являются наиболее изученными объектами молекулярной генетики. Однако независимо от того, какой именно фаг используется для селекции какой именно бактериальной культуры, все эти методы основаны на общих принципах.

Так, отбор бактериальных мутантов осуществляется путем инфекции клеток фагом (например, [1—10]) или индукции лизогенов (в частности, [11—14]). В первом случае для селекции могут использоваться как умеренные, так и вирулентные фаги, а во втором, в силу очевидных причин, только умеренные.

К наиболее простым можно отнести методы, основной стратегией которых является получение бактериальных мутантов, ограничивающих какой-либо этап фагового развития. Такие бактериальные мутанты отбирают среди выживших бактериальных клеток после фаговой инфекции или индукции. При этом положительный результат может достигаться без создания особых селективных условий.

Однако успехи, достигнутые при изучении взаимодействия фаговых и клеточных белков, позволяют разрабатывать более сложные селекционные системы с использованием различных мутантных фагов. Так, в работе [3] продемонстрирована возможность отбора клеток *E. coli*, чувствительных к тетрациклину или хлорамфениколу, из популяции устойчивых клеток с помощью фага  $\lambda$  vir. Предложенный автором метод основан на том, что при определенных условиях фаг  $\lambda$  vir предпочтительно убивает бактерии, устойчивые к антибиотикам. Это достигается индукцией синтеза  $\lambda$ -рецепторов при добавлении в питательную среду сАМР и мальтозы в присутствии хлорамфеникола или тетрациклина — антибиотиков, ингибирующих синтез белка. При этом устойчивые клетки могут синтезировать большое число рецепторов, тогда как чувствительные клетки не способны отвечать на индукцию,

поскольку белковый синтез у них блокирован. Поэтому после инфекции бактериальных клеток фагом  $\lambda$  vir в вышеописанных селективных условиях среди выживших клеток до 65 % составили искомые мутанты [3].

В нашей лаборатории разработан метод селекции  $Su^0$  ревертантов из  $Su^+$  штаммов *E. coli* с помощью бактериофага  $\lambda$  [2]. В основу селекции положена разница в жизнеспособности  $Su^0$  и  $Su^+$  клеток, несущих фаг  $\lambda$  с амбер-мутацией в *N* гене. Фаг  $\lambda$ , мутантный по гену *N*, не способен лизировать клетку-хозяина и находится в ней в виде крайне нестабильных плазмид. Если клетка-хозяин содержит супрессорный ген, то амбер-мутация фенотипически исправляется, *N* белок синтезируется и фаг может развиваться по литическому пути. Для селекции  $Su^0$  ревертантов нами использован фаг  $\lambda cI857Ap^R Tc^R Nam7Nam53$ . В результате высева инфицированного этим фагом клеток  $Su^+$  штамма *E. coli* на среду с ампициллином и тетрациклином при температуре 43 °С выросли единичные клетки, несущие фаг  $\lambda cI857Ap^R Tc^R Nam7Nam53$ , около 50 % из которых являлись  $Su^0$  ревертантами. Излечив эти клетки от фага, нами были получены изогенные  $Su^0$  производные исходных  $Su^+$  культур, спонтанная частота возникновения которых составила  $10^{-7}$  [2].

Данные работы являются примером осуществления селекции путем инфекции фагом реципиентных клеток. Однако, как уже упоминалось, ее можно проводить и путем индукции лизогенов.

В частности, Фридман с соавт. для отбора *nusB* мутантов *E. coli* использовали фаг  $\lambda cI tsint p^-$  [11]. Принцип селекции этих мутантов заключается в следующем. Как известно, для функционирования *N* белка фага  $\lambda$  необходим продукт гена *nusB*. Поэтому в *nusB* мутантах развитие фага ограничено, и в результате индукции  $\lambda$  профага клетка-хозяин не лизируется. Чтобы исключить фаговые мутации, которые могут обеспечить такой же эффект, авторы для селекции бактериальных мутантов использовали лизогены K386 ( $\lambda cI tsint p^-$ ), несущие много копий профага. Мутация в *int* гене профага уменьшает вероятность его исключения и появления в лизогенной популяции «излеченных» клеток. Мутация *ts* в *cI* гене обеспечивает индукцию профага при повышении температуры до 42 °С. Для получения бактериальных мутантов, ограничивающих функционирование *N* белка, лизогенные бактерии K386 ( $\lambda cI tsint p^-$ ), выращивали в бульоне до плотности  $10^8$  клеток в 1 мл, высевали на чашки с агаром, которые затем инкубировали при температуре 42 °С. Выжившие бактерии обнаруживались с частотой  $10^{-6}$ — $10^{-7}$ . Клоны, на которых при 42 °С мог развиваться *N*-независимый фаг  $\lambda cI 17bypN$  и не мог развиваться *N*-зависимый фаг  $\lambda cI ts$ , и были искомыми мутантами [11].

Либке и Спейер [12] с помощью фага  $\lambda$  выделили новый спонтанный температурочувствительный мутант *E. coli*, в клетках которого при изменении температуры с 30 на 42 °С быстро прекращается синтез стабильных РНК. Принцип отбора такого мутанта заключается в следующем. При термоиндукции лизогенной культуры, несущей профаг с *ts* мутацией в *cI* гене, репрессор инактивируется, фаг развивается по литическому пути и основная масса клеток лизируется. При этом существует вероятность того, что среди выживших после термоиндукции клеток будут и бактериальные мутанты, в которых нарушен синтез РНК. Для отбора такого мутанта авторы использовали фаг  $\lambda_{plac5cI857s}$ . Этот фаг имел ауксотрофный маркер  $z^+$ , позволяющий  $z^-$  клетке-хозяину расти на среде М9 с лактозой, являющейся субстратом для  $\beta$ -галактозидазы — фермента, кодируемого *z*-геном. Таким образом, использование маркированного фага обеспечивало в селективных условиях рост только несущих его клеток.

Для селекции температурочувствительных мутантов авторы выращивали лизогенные бактерии на среде М9 с лактозой, инкубировали культуру в течение 60 мин при температуре 42 °С, а затем высевали клетки на чашки, которые выдерживали при 32 °С. Среди выживших клонов с частотой  $10^{-9}$  отобран искомый мутант, излеченный впоследствии от фага  $\lambda_{plac5cI857s}$ . Полученные нелизогенные клетки имели фенотип *lac*<sup>-</sup> [12].

Из литературы известны работы, в которых для селекции бактериальных мутантов путем индукции лизогенов используют и другие фаги. Так, Могутовым с соавт. [13] предложен метод отбора бактериальных мутаций, блокирующих развитие фага  $\mu$ , основанный на его способности вызывать гибель клетки в процессе транспозиции. Для отбора использован специально сконструированный мини- $\mu$  фаг с инактивированным геном *kil*, способный к автономной транспозиции и убивающий клетку при индукции. Авторами показано, что при блокировании бактериальной мутацией транспозиции фага  $\mu$  клетка остается жизнеспособной, что делает возможным отбор таких мутаций [13].

Следует учитывать, что селекция путем индукции профага не позволяет отбирать мутанты, в которых блокированы самые ранние этапы фагового развития, а именно — адсорбция фага и инъекция фаговой ДНК. Однако это является преимуществом, если перед исследователем не стоит задача выявления именно таких мутантов, поскольку среди выживших клеток они будут отсутствовать, увеличивая тем самым вклад искоемых мутантов.

Другое преимущество, имеющее место при ведении селекции путем индукции профага, это то, что для такой селекции, как правило, используют

фаги с *ts* мутацией в гене репрессора, и после индукции профага во всех клетках начинается литическое развитие фага. При этом в процесс селекции вовлечены все клетки популяции, в то время как при инфицировании бактериальной культуры очень сложно добиться того, чтобы все клетки были заражены фагом.

Однако, если исследователи хотят снизить до минимума вероятность роста среди выживших после заражения фагом лизогенных клеток и клеток, несущих мутации в гене, кодирующем рецептор для данного фага, они используют некоторые приемы. Например, для избежания роста среди выживших после инфекции клеток, в которых нарушен самый первый этап инфекционного процесса — адсорбция фагов на клеточных рецепторах, исследователи используют для селекции гибриды фагов с разной специфичностью адсорбции [15, 16] или инфицируют культуру одновременно несколькими фагами [17]. Чтобы исключить содержание лизогенных особей среди выживших после инфекции клеток для селекции используют мутанты фага, не способные к лизогенизации [3, 7, 17, 18], или с очень низкой частотой лизогенизации [15, 16].

Это можно продемонстрировать на примере следующих работ. Одоевская и Синеокий [15, 16] получили серию иммуноспецифических мутантов *gpr*<sup>-</sup> с помощью фага  $\phi_{M173}(\text{im}\phi 80)$ , которые отличаются от ранее известных мутантов, блокирующих развитие лямбдоидных фагов. Для селекции авторами использован С-мутант фага  $\phi_{M173c8}$ , не способный лизогенизировать инфицированную клетку, что исключало вероятность появления среди устойчивых колоний лизогенов по фагу  $\phi_{M173}$ . Кроме того, чтобы при отборе мутантов, устойчивых к фагу  $\phi_{M173c8}$ , исключить отбор мутантов, не адсорбирующих этот фаг, путем скрещивания фага  $\phi_{M173c8}$  с фагами 434 и лямбда авторами получены гибриды фага  $\phi_{M173c8}$  с разной специфичностью адсорбции. Мутанты *E. coli*, специфично ингибирующие фаг  $\phi_{M173}(\text{im}\phi 80)$ , получены с частотой  $10^{-8}$  в результате выявления спонтанных мутаций *E. coli* при высевае бактериальной культуры на фаговый газон. Обработка мутагеном бактериальной культуры перед высевом на фаговый газон привела к увеличению на два порядка частоты появления устойчивых к фагу колоний, составившей  $10^{-6}$ .

Мутации могут затрагивать как бактериальные, так и фаговые геномы. Поэтому среди выживших после инфекции клеток могут быть не только искомые мутанты, утратившие чувствительность к фагу, и клетки, лизогенизированные фагом (в случае использования умеренных бактериофагов), но также могут встречаться особи, несущие дефектные фаги, утратившие способность к литическому раз-

виту. Чтобы исключить появление таких клонов, исследователи используют высокую множественность инфекции [2, 19] или много копий профага [11].

В литературе описаны также методы, позволяющие в противоположность вышеописанным при определенных условиях отбирать клетки, в которых не блокируется развитие фага. Отличительной особенностью этой группы методов является то, что все они осуществляются через этапы отбора лизогенов, а затем излечения их от фага, используемого для селекции. Как правило, для этих целей авторы применяют фаги, несущие маркеры антибиотикоустойчивости или ауксотрофности, что позволяет легко отобрать содержащие фаг клетки на селективной среде. Если для селекции используют фаг без селективных маркеров, то для обогащения популяции лизогенными клетками культуру можно суперинфицировать аналогичным фагом.

Например, с помощью различных мутантов фага  $\lambda$  Гайдис выделил клоны *E. coli*, дефектные по системе рестрикции и модификации [5]. Сначала автор заразил клетки штамма *E. coli* K12 D22 фагом  $\lambda cI857$ . При этом в большинстве клеток инъекционная фаговая ДНК разрушалась. Однако фаг лизогенизировал мутанты по рестрикции и модификации, что придавало им иммунитет к повторному заражению аналогичным фагом  $\lambda$ . Для гибели нелизогенных клеток культуру суперинфицировали фагом  $\lambda b2cI$ , гомоспецифичным к фагу  $\lambda cI857$ . Это привело к обогащению популяции искомыми мутантами, число которых среди выживших клеток составило 4—5%. Используя фаг  $\lambda$  vir, автор различал  $r^+m^+$  и  $r^-m^-$  мутанты. Отобранные клоны впоследствии были излечены от профага  $\lambda cI857$  [5].

Год спустя другими авторами [8] был предложен более простой метод селекции мутантов по системе рестрикции—модификации из штаммов *E. coli*. Селекцию таких мутантов осуществляли с помощью фага  $\lambda L413$ , несущего транспозон Tn10, который детерминирует устойчивость клетки-хозяина к тетрациклину. Отбор искомых мутантов проводили следующим образом. Чувствительные клетки *E. coli* инфицировали фагом  $\lambda L413$ , а затем отбирали лизогены, устойчивые к тетрациклину. Среди 100 проверенных колоний 56 клонов имели фенотип  $r^+m^+$ , 31 клон —  $r^-m^-$  и 13 клонов —  $r^-m^+$ . Отобранные мутанты были легко излечены от профага после инкубации при 42 °С. При этом бактерии вместе с фагом утратили Tn10 и стали чувствительными к тетрациклину [8].

Аналогичный подход использован Дункан [20] для селекции различных мутантов по гену *ung*, кодирующему урацил-ДНК гликозилазу *E. coli*. Селекция основана на том, что ДНК, содержащая

вместо тимина урацил, деградирует в *ung*<sup>-</sup> клетках в процессе репарации. Для селекции таких мутантов автор использовал специально полученный фаг  $\lambda$ , в ДНК которого присутствовал урацил. Кроме того, фаг детерминировал устойчивость несущих его клеток к канамицину. При инфицировании этим фагом бактериальной культуры, предварительно подвергнутой мутагенезу, фаговая ДНК в клетках, несущих мутации в *ung* гене, не деградировала, и лизогенизированные фагом клетки отбирались автором на среде с канамицином [20].

Голдберг с соавт. [21] для направленной селекции мутантов энтеробактерий, чувствительных к бактериофагу P1, из устойчивых к нему штаммов использовали специально сконструированный фаг *P1clr100KM*, привносящий в клетку маркеры устойчивости к канамицину. При инфицировании таким фагом популяции устойчивых клеток фаг лизогенизирует единичные чувствительные клетки, которые отбираются на среде, содержащей канамицин. В дальнейшем эти клетки излучивали от профага, что является относительно простой задачей благодаря наличию в нем мутации *clr100*. В излеченных клетках восстанавливалась чувствительность к канамицину и способность расти при повышенной температуре. Используя этот подход, авторами получены P1-чувствительные мутанты *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citobacter* и *Erwinia* [21].

В нашей лаборатории разработан метод селекции нелизогенных клеток из лизогенных по фагу лямбда штаммов *E. coli* с помощью фага  $\lambda$ . При разработке метода мы исходили из того, что в любой популяции лизогенных клеток присутствуют особи, спонтанно утратившие профаг. При инфицировании культуры аналогичным фагом, в отличие от основной массы лизогенных клеток, фаг может лизогенизировать только клетки, лишённые профага. Если фаг привносит в клетку селективный маркер (в данном случае устойчивость к ампициллину и тетрациклину), то лизогенизированные им клетки можно легко отобрать на селективной среде. А наличие *ts* мутации в гене репрессора позволяет легко излечить эти клетки от фага, так как большинство клеток, несущих такой фаг, при выращивании при температуре 37 °С освобождается от фага с термолabileм репрессором в результате abortивной индукции и становится нелизогенными.

Для селекции нелизогенных клеток из лизогенных по фагу  $\lambda$  штаммов *E. coli* нами использованы фаги  $\lambda cI857Ap^R Tc^R$  [22, 23] и  $\lambda cI857Ap^R Tc^R Nam7Nam53$  [24, 25]. Оба фага показали близкие результаты, однако использование последнего имеет ряд преимуществ. Этот фаг несет две амбер-мутации в гене *N* и поэтому в непермиссивном хозяине не способен ни интегрировать в бактериальную хромосому, ни лизировать зараженную

клетку. Использование такого дефектного фага не может привести к образованию криптических профагов, которых нельзя обнаружить по наличию иммунитета. К тому же такой фаг не интегрирует в бактериальную хромосому, а находится в клетке в виде крайне нестабильных плазмид. Поэтому при использовании его для селекции не могут появиться клетки с дефектным генотипом, вероятность чего существует при неправильном выщеплении фага, когда он может захватывать часть бактериальной хромосомы. Кроме того, поскольку фаг не способен лизировать клетку-хозяина, то все инфицированные им нелизогенные клетки остаются жизнеспособными, что позволяет достаточно точно определять частоту возникновения нелизогенных клеток в популяции лизогенов. Так, нами показано, что в исследованных лизогенных по фагу  $\lambda$  штаммах *E. coli* нелизогенные клетки появляются с частотой  $10^{-4}$ .

Нами также показана возможность использования фага *lc1857Ap<sup>R</sup>Tc<sup>R</sup>Nam7Nam53* для отбора чувствительных к фагу  $\lambda$  ревертантов из популяции устойчивых к нему клеток *E. coli* [1].

В основном все методы отбора мутантов с использованием бактериофагов, относящиеся как к первой (селекция мутантов, не поддерживающих развитие фага), так и ко второй группам (селекция мутантов, поддерживающих развитие фага), осуществляются путем отбора в селективных условиях выросших колоний. При этом подавляющее большинство клеток популяции, из которой отбираются такие особи, либо погибает в результате литического развития фага, либо не дает роста на селективной среде. Таким образом, основным критерием селекции является наличие роста колоний на селективной среде. Однако в литературе описаны и другие способы оценки отбора.

Так, известны примеры, когда с помощью бактериофага отбирали мутанты по морфологической характеристике бактериальных колоний. Например, в работе [26] авторами с помощью фага T4 получены мутанты *E. coli* по *recBC* нуклеазе, которые в отличие от ранее исследованных *recBC* мутантов обладали способностью к гомологичной рекомбинации и имели почти нормальную УФ-чувствительность. Отбор этих мутантов авторы осуществили с помощью фага T4, несущего мутацию в гене 2 и не способного размножаться в клетках *E. coli* из-за быстрой деградации ДНК под воздействием *recBC* нуклеазы. Авторами были отобраны мутанты *E. coli*, поддерживающие развитие используемого для селекции фага. В основу селекции положено наблюдение авторов, что *recBC* мутанты *E. coli*, чувствительные к фагу T4 2<sup>-</sup>, в присутствии этого фага на твердой питательной среде формируют «изъеденные» (*nibbele*) колонии [26].

В литературе также описан метод [14], при котором авторы, используя достаточно сложную систему селекции, осуществляют отбор бактериальных мутантов с помощью бактериофага Mu по наличию или отсутствию зоны лизиса вокруг колонии. Данный метод позволяет выявлять бактериальные мутанты как нарушающие, так и способствующие развитию фага Mu. Изолирование таких мутантов проводится в бактериальном штамме, несущем профаг Muc62 в хромосоме и дефектный профаг Muc<sup>+</sup> в составе нестабильной и элиминирующей с высокой частотой плазмиды («рабочий» штамм). Клетки такого штамма при температуре 43 °C образуют колонии благодаря доминированию с<sup>+</sup> аллеля в составе плазмиды над аллелем *cts* в составе хромосомы. Однако часть клеток в растущей колонии теряет плазмиду с Muc<sup>+</sup> геном и гибнет в результате индукции профага Muc62. При этом выделяется большое количество фаговых частиц, которые при росте колонии «рабочего» штамма на газоне «тест» штамма, чувствительного к фагу Mu, обуславливают лизис клеток. Отсутствие зоны лизиса вокруг колонии «рабочего» штамма свидетельствует о неспособности клеток данного клона продуцировать жизнеспособные частицы фага Mu вследствие возникновения мутаций в бактериальном или фаговом геномах. При использовании в качестве «рабочего» штамма, исходно не способного поддерживать развитие фага Mu, возникает обратная ситуация. Отбор мутантов производится на цветных индикаторных средах, на которых клетки «рабочего» штамма образуют окрашенные колонии, а «тест» штамма — бесцветный газон [14].

Описаны примеры выявления особей, несущих мутантные гены не только в составе бактериальной хромосомы, но и в составе плазмиды. Например, выделить новые *grpE* мутанты *E. coli* удалось следующим образом. Авторами [17] сконструирована плаزمида, содержащая дикий тип *grpE* гена. Затем для увеличения вероятности получения мутаций в *grpE* гене ее подвергли мутагенезу, после чего трансформировали в бактериальный штамм с делецией *grpE* гена в хромосоме. Трансформированные клетки высевали на чашки со средой с ампициллином, которые инкубировали в течение ночи при 30 °C. Отобранные Ap<sup>r</sup> трансформанты инфицировали смесью мутантных фагов *lcI* и 434c<sup>-</sup>, не способных лизогенизировать инфицированную клетку, и высевали на содержащие ампициллин чашки, которые инкубировали 24 ч при температуре 37 или 42 °C. Среди выживших после инфекции клонов были отобраны искомые мутанты [17]. Следует обратить внимание на то, что селекцию гомологичных мутантных генов в составе плазмидных ДНК можно проводить только в бакте-

риальных клетках, в которых не синтезируются полноценные продукты аналогичных хромосомных генов.

Получение и отбор мутантных генов в составе плазмид является перспективным методом. Он позволяет с большой вероятностью выявлять мутанты конкретного гена, осуществлять мутагенез только плазмидной ДНК, несущей целевой ген, не подвергая при этом действию мутагенов клетку-хозяина, проводить исследование в направлении не от функции к гену, а наоборот — от гена к функции, а также делает возможным селекцию мутаций в генах гетерологичного происхождения (например, [27, 28]).

В работе [27] авторы изолировали с помощью производных фага P22 клетки *Salmonella typhimurium*, содержащие мутантный фактор интеграции хозяина (ИНФ) *E. coli* с измененной ДНК-связывающей специфичностью. Для этого сконструирована плаزمида, несущая *himA* и *hip* (*himD*) гены, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы ИНФ *E. coli* под контролем регулируемого IPTG Ptac промотора, а также маркер устойчивости к ампициллину. После мутагенеза плазмиду трансформировали в клетки *S. typhimurium*, несущие вставки в хромосомных *himA* и *hip* генах. Для селекции клеток, содержащих мутантный ИНФ, авторы использовали специально сконструированные производные фага P22. Эти фаги несли ген, детерминирующий устойчивость к канамицину, а также мутантные ИНФ Н' узнающие сайты фага  $\lambda$ . Литическое и лизогенное развитие таких Н' фагов зависит от того, имеет ли место связывание молекулы ИНФ, синтезируемой на плазмиде при индукции IPTG с Н' сайтом фага  $\lambda$ , находящемся в составе фага P22. Селекция основана на том, что с мутантным Н' сайтом могут связываться только измененные молекулы ИНФ, образовавшиеся в результате появления супрессорных мутаций в *himA* и *hip* генах, что приводит к формированию лизогена. Если таких мутаций нет, то связывания не происходит и фаг развивается по литическому пути. Селекцию осуществляли инфицированием фагом культуры, несущей плазмиду с целевыми генами, и последующим высевом инфицированных клеток на чашки с агаризованной средой, содержащей IPTG, ампициллин и канамицин. Из выросших лизогенов авторы выделяли плазмидную ДНК с мутантными целевыми генами и вновь трансформировали в бактериальные клетки. Полученные трансформанты с высокой частотой формировали лизогены и были объектом для дальнейшего изучения [27].

Для отбора мутантов бактериальных генов можно использовать не только полноценные фаги или их мутанты, но и отдельные фрагменты фагового генома. Так, в работе [28] для выявления

миссенс- и нонсенс-мутаций в *luxR* гене *Vibrio fischeri* авторы использовали гены лизиса бактериофага  $\lambda$ . Селекцию мутантов осуществляли в клетках *E. coli*, несущих целевой ген гетерологичного происхождения в составе плазмидной ДНК, подвергнутой перед трансформацией мутагенезу. Плазмида сконструирована таким образом, что после добавления в среду культивирования индуктора начинался синтез продукта *luxR* гена и, если он не нес мутаций, то происходил синтез полноценных продуктов генов фага  $\lambda$  S, R, Rz, что приводило к лизису бактериальной клетки. Если *luxR* ген нес мутации, то продукты генов лизиса фага не синтезировались и клетка оставалась жизнеспособной. Используя данный подход, авторами было отобрано два нонсенс- и шесть миссенс-мутантов *luxR* гена *V. fischeri* [28].

Манипулируя температурными условиями ведения отбора, исследователи с помощью фагов получают температурочувствительные мутанты (например, [12, 29, 30]). Такие мутанты очень удобны в изучении биохимической характеристики их продукта, что облегчает понимание механизма его действия. Так, в работе [30] описано получение с помощью бактериофага  $\lambda$  температурочувствительных *htrR* (*rpoH*) мутантов *E. coli*. С помощью фага  $\lambda$  выделен новый спонтанный температурочувствительный мутант *E. coli*, в клетках которого при изменении температуры с 30 на 42 °C нарушается синтез стабильных РНК [12], а также *ts* мутант *E. coli* K-12 *groES131*, в котором при непермиссивной температуре нарушен синтез как РНК, так и ДНК клетки и в котором даже при пермиссивной температуре не способен развиваться фаг  $\lambda$  [19]. В работе [29] авторы изолировали мутант *E. coli*, в котором ограничен рост бактериофага T4 при температуре выше 40 °C. В работе [17] с помощью бактериофагов *lcf* и 434с авторы выделили две группы *ts* мутантов *E. coli* по гену *grpE*. Первую группу составляют мутанты, в которых фаг  $\lambda$  не развивается ни при 30, ни при 43 °C. Вторую — мутанты, чувствительные к фаговой инфекции при 30 и устойчивые — при 43 °C.

В литературе описано использование фагов для селекции как спонтанных мутантов (например, [2, 4, 5, 22—25]), так и мутантов, появившихся в результате мутагенеза. Это зависит от цели исследования. Если интересующие мутации спонтанно возникают с достаточно высокой частотой, то нет необходимости подвергать бактериальные клетки мутагенезу. Если перед исследователем стоит задача получения как можно большего количества мутантных особей, то культуру перед инфицированием (в частности, [17, 19, 20, 26, 28, 31, 32]) или плазмидную ДНК, несущую целевой ген, перед трансформацией [17, 27, 28] подвергают мутагене-

зу. Сравнение частоты возникновения мутантов без мутагенеза и после него позволяет делать выводы об эффективности последнего. Например, в работах [15, 16] показано, что обработка культуры мутагеном на два порядка повысила частоту появления искомым мутантов, в работе [20] — на четыре. В свою очередь, изучение частоты возникновения только спонтанных мутантов позволяет оценить гетерогенность популяций по конкретному признаку. Кроме того, если стоит задача получения изогенных производных исходного штамма, то использование мутагенеза недопустимо, так как возникает высокая вероятность того, что мутации могут затронуть, кроме целевого, и другие бактериальные гены. Также нужно быть осторожными и с выбором фага для селекции, поскольку сами фаги могут быть факторами мутагенеза (например, бактериофаги Mu, P1, фаги, несущие транспозоны). Такие фаги могут быть инструментом не только для отбора бактериальных мутантов, но и для получения самих мутаций [33]. Поэтому, если необходимо получить изогенные производные, исследователи стараются использовать такие системы селекции, которые свели бы подобную вероятность до минимума.

Так, нами для селекции изогенных  $Su^0$  ревертантов из  $Su^+$  штаммов *E. coli* использован мутант фага  $\lambda$ , утративший способность встраиваться в геном клетки, что исключало появление как криптических профагов, так и захвата участка бактериальной хромосомы при его выщеплении. Помимо того, его геном не содержал транспозонов, а устойчивость к антибиотикам несущих его клеток определялась генами антибиотикоустойчивости, входящими в состав встроенной в него плазмидной ДНК [2].

Используя один фаг как инструмент для отбора бактериальных мутантов, исследователи часто в своих работах используют другие фаги для анализа полученных мутантов. Это позволяет им не только сравнивать вновь полученные мутанты с ранее описанными, но и изучать влияние продукта дефектного гена на развитие различных фагов и тем самым проникать в суть механизма его действия. Так, Тессман и Петерсон выделенные  $rep^-$  мутанты *E. coli* C с помощью фага  $\phi$ X174 анализировали на способность поддерживать развитие фагов S13, G6, M13 и P2 [32]. Джералдини с соавт. выделили *gyrB* мутанты *E. coli* K-12, которые не поддерживали ни литического развития, ни лизогенизации фага Muliqts2. Исследователями установлено, что в отобранных мутантах ингибировалось также развитие бактериофагов D108 и P1 [34]. Такахаши с соавт. выделили и охарактеризовали серию мутантов *E. coli* K-12, в которых блокировался репродуктивный цикл фага  $\lambda$ . Авторами показано, что ото-

бранные мутанты были устойчивы ко всем лямбдоидным фагам за несколькими исключениями, но в то же время были чувствительными к не-лямбдоидному умеренному бактериофагу  $\phi$ hi299, P1 и T-фагам [10].

Иноко с соавт. изолировали температурочувствительные *nitA* (*rho*) мутанты *E. coli* с помощью фага  $\lambda$ susN7nin5. В этих мутантах при повышенной температуре не развивался ни фаг  $\lambda$ , ни фаг T4, в то же время развитие фага T7 не нарушалось [35]. Сканделла и Арбер [18] с помощью фага  $\lambda$  vir изолировали *pef* мутанты *E. coli*, в которых ингибировалась инъекция ДНК фага  $\lambda$ . Авторами установлено, что, кроме фага  $\lambda$ , в этих мутантах не развиваются фаги 434 и 82 и при этом не ограничивается развитие фагов  $\phi$ 80, T4, P1, P2 и M13.

В качестве инструмента для анализа полученных мутантов исследователи используют не только другие фаги, но и специально выделяют мутанты использованного для селекции фага, которые преодолевают мутации в отобранных бактериальных клетках, что вносит весомый вклад в понимание взаимодействия бактериального и фагового белков [10, 16, 18, 29, 32].

Следует отметить, что в подавляющем большинстве описанные в литературе методы селекции измененных особей с использованием фагов, как впрочем, и другие способы селекции, являются методами накопления искомым мутантов и не обеспечивают то, что в конкретных селективных условиях отобранные колонии несут мутацию лишь в каком-то конкретном гене. Это обусловлено тем, что мутации в разных бактериальных генах могут давать одинаковые фенотипы и обеспечивать рост в селективных условиях мутантов по разным генам (например, [10]).

Определенные сложности возникают при селекции мутантов, фенотип которых обеспечивается мутациями одновременно в нескольких генах. Так, в частности, трудно получить устойчивые к бактериофагу T2 мутанты *E. coli* В стандартной процедурой, поскольку устойчивость клеток к этому фагу появляется в результате двух мутаций. Поэтому намного легче получить такие мутанты селекцией в два этапа, как это было предложено Ленски [36]. Одна из мутаций, обуславливающих устойчивость клеток к фагу T2, обеспечивает устойчивость и к фагу T4. На основании этого автором сначала были изолированы мутанты, устойчивые к фагу T4, а из последних уже отобраны мутанты, устойчивые к фагу T2.

Не всегда можно добиться положительного результата при селекции ревертантов. Так, если инактивация функции гена произошла в результате не точечной мутации или вставки, а делеции, то точного восстановления поврежденной части гена

не может быть. Также не всегда можно рассчитывать на отбор вторичных ревертантов или особей с супрессорными мутациями в других генах. Например, нам не удалось отобрать чувствительные к фагу  $\lambda$  особи из некоторых устойчивых к фагу  $\lambda$  штаммов *E. coli* (неопубликованные данные). Голдберг с соавт. не удалось осуществить селекцию мутантов, чувствительных к бактериофагу P1, из устойчивых к нему штаммов *Pseudomonas putida* и *S. typhimurium* [21].

Однако все эти ограничения общего характера и не связаны с тем, что для селекции в качестве инструмента используются бактериофаги. Существенным ограничением при таких типах селекции является устойчивость к этим фагам бактериальных клеток, которая может быть обусловлена различными факторами. Однако разработанные нами [1, 22–25] и другими авторами [21] методы селекции чувствительных клеток из устойчивых к фагу бактериальных штаммов позволяют в некоторых случаях преодолевать это ограничение. В частности, нами из популяции устойчивого к фагу  $\lambda$  штамма *E. coli* SG20050 с помощью фага  $\lambda$ c1857-*Ap<sup>R</sup>Tc<sup>R</sup>Nam7Nam53* отобраны чувствительные к фагу  $\lambda$  клоны [1]. Затем, используя разработанный нами ранее метод селекции *Su<sup>0</sup>* ревертантов из *Su<sup>+</sup>* штаммов *E. coli* [2], с помощью этого же фага отобраны *Su<sup>0</sup>* производные полученных нами чувствительных к фагу  $\lambda$  клонов *E. coli* SG20050. Впоследствии эти клоны были с успехом использованы нами в качестве продуцента  $\alpha$ -интерферона человека (неопубликованные данные).

Таким образом, манипулируя вышеописанными приемами, можно избирать ту или иную стратегию селекции мутаций в бактериальных генах. При этом фаги могут служить инструментом не только для изоляции, но и для получения, тестирования и изучения отобранных мутантов. Это позволяет выявлять гены, мутации в которых приводят к нарушению различных этапов фагового развития, выяснять участие продуктов этих генов как в процессе фагового развития, так и в жизнедеятельности самой клетки, изучать генетический контроль многих клеточных процессов, регуляцию выражения ряда оперонов, отбирать мутанты, перспективные для использования в работах прикладного характера. И хотя в таких клетках мутации обуславливают потерю генетической функции, трудно выявляемую фенотипически, использование бактериофага для их отбора позволяет осуществлять прямую селекцию таких мутантов. Эти работы демонстрируют возможность и перспективы использования фагов как инструмента для отбора из бактериальной популяции особей, обладающих интересующими исследователя свойствами, для решения различных задач в области микробиологии,

вирусологии, молекулярной генетики, молекулярной биологии и генно-инженерной биотехнологии.

*I. Yu. Slavchenko*

The strategy of bacteriophages use as an instrument for the selection of different mutants in cell population

Summary

*The methodological approaches for the selection of bacterial mutants using bacteriophages have been analysed and summarised for the first time. The strategy of bacteriophages usage as an instrument for the selection of changed cells with properties of the author's interest has been developed on the base of the literary data and own experience. The examples of such strategy for different taxonomic groups have been given. Probable difficulties during the process of mutants selection, the limitations of the selection methods proposed and the means to overcome them have been considered. Possibilities and perspectives of bacteriophages usage for the selection of bacteria bearing mutations in genes of homologous and heterologous origin have been discussed. The examples of practical application of this strategy for the solution of both fundamental and applied tasks have been demonstrated.*

*I. Ю. Славченко*

Стратегія використання бактеріофагів як інструменту для відбору різних мутантів у популяції клітин

Резюме

*В огляді вперше проаналізовано і узагальнено методологічні підходи відбору бактеріальних мутантів з використанням фагів. На підставі літературних даних і власного досвіду автора представлено стратегію застосування бактеріофагів як інструменту для селекції з бактеріальної популяції змінних клітин, що мають цікаві для дослідника властивості. Описано приклади використання різних бактеріофагів для відбору мутантів бактерій, які відносяться до різних таксономічних груп. Розглянуто труднощі, які можуть мати місце в процесі відбору мутантів, обмеження в застосуванні таких методів селекції і способи їхнього подолання. Обговорено можливість та перспективи використання фагів для відбору бактерій, що несуть мутації в генах як гомо-, так і гетерологічного походження. Наведено приклади практичного застосування таких методів селекції для вирішення різних завдань як фундаментального, так і прикладного характеру.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу лямбда клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—2001.—17, № 2.— С. 160—165.
2. Славченко И. Ю., Черных С. И., Нечипорчук М. Я., Кордюм В. А. Отбор бессупрессорных клеток из штаммов *Escherichia coli Su<sup>+</sup>* // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1986.—№ 6.—С. 42—44.
3. Craine B. L. Novel selection for tetracycline or chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1982.—151, N 1.—P. 487—490.
4. German G. J., Misra R. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage // J. Mol. Biol.—2001.—308, N 4.—P. 579—585.
5. Guidice L. D. Method of isolating restriction- and modification-



- less mutants of *Escherichia coli* K12 // *J. Bacteriol.*—1979.—137, N 1.—P. 673—676.
6. Hoenger A., Ghosh R., Schoenenberger C. A., Aebi U., Engel A. Direct *in situ* structural analysis of recombinant outer membrane porins expressed in an OmpA-deficient mutant *Escherichia coli* strain // *J. Struct. Biol.*—1993.—111, N 3.—P. 212—221.
  7. Nesper J., Kapfhammer D., Klose K. E., Merkert H., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 antigen as the bacteriophage K139 receptor and identification of IS1004 insertions aborting O1 antigen biosynthesis // *J. Bacteriol.*—2000.—182, N 18.—P. 5097—5104.
  8. Piechaczyk M., Jeanteur P., Louarn J. M. An easy method for the selection of restriction- and modification-deficient mutants of *Escherichia coli* K12 // *Gene.*—1980.—II, N 1—2.—P. 173—175.
  9. Schneider H., Fsihi H., Kottwitz B., Mygind B., Bremer E. Identification of a segment of the *Escherichia coli* Tsx protein that functions as a bacteriophage receptor area // *J. Bacteriol.*—1993.—175, N 10.—P. 2809—2817.
  10. Takahashi S., Hidaka S., Matsubara K. Isolation and properties of *Escherichia coli* mutants which are nonpermissive for the growth of phage lambda // *Jap. J. Microbiol.*—1975.—19, N 5.—P. 373—380.
  11. Friedman D. I., Baumann M., Baron L. S. Cooperative effects of bacterial mutations affecting N gene expression. I. Isolation and characterization of a nusB mutant // *Virology.*—1976.—73.—P. 119—127.
  12. Liebke H. H., Speyer J. F. I new gene in *E. coli* RNA synthesis // *Mol. and Gen. Genet.*—1983.—189, N 2.—P. 314—320.
  13. Могутов М. А., Великодворская Г. А., Павлова Г. В., Пирузян Э. С. Метод прямого отбора мутаций *Escherichia coli* K12, блокирующих развитие фага Mu // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1984. № 2.—С. 20—25.
  14. Пирузян Э. С., Корецкая Н. Г. Общий метод отбора мутаций в бактериальных и фаговых генах, существенных для развития бактериофага Mu // Генетика.—1983.—19, № 5.—С. 744—748.
  15. Одоевская Е. П., Синеокий С. П. Выделение мутантов *Escherichia coli* K12, влияющих на развитие фага фм173(immp80) // Генетика.—1985.—21, № 4.—С. 673—675.
  16. Одоевская Е. П., Синеокий С. П. Выделение и генетическое изучение бактериальных мутаций, блокирующих репликацию некоторых лямбдоидных фагов // Генетика.—1987.—23, № 4.—С. 643—652.
  17. Wu B., Snavely M., Georgopoulos C. Isolation and characterization of point mutations in the *Escherichia coli* *grpE* heat shock gene // *J. Bacteriol.*—1994.—176, N 22.—P. 6965—6973.
  18. Scandella D., Arber W. An *Escherichia coli* mutant which inhibits the injection of phage lambda DNA // *Virology.*—1974.—58.—P. 504—513.
  19. Wada M., Itikawa H. Participation of *Escherichia coli* K-12 *groE* gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA // *J. Bacteriol.*—1984.—157, N 2.—P. 694—696.
  20. Duncan B. K. Isolation of insertion, deletion, and nonsense mutation of the uracil-DNA glycosylase (*ung*) gene of *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.*—1985.—164, N 2.—P. 689—695.
  21. Goldberg R. V., Bender R. A., Streicher S. L. Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria // *J. Bacteriol.*—1974.—118.—P. 810—814.
  22. Кордюм В. А., Черных С. И., Медведева И. Ю. Получение нелизогенных бактерий из лизогенных при помощи фага, несущего устойчивость к антибиотикам // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1983.—3.—С. 32—35.
  23. Kordyum V. A., Chernykh S. I., Medvedeva I. Yu. Isolation of nonlysogenic bacteria from lambda lysogenised strains using antibiotic-resistant phage // *Can. J. Microbiol.*—1984.—30.—P. 74—76.
  24. Славченко И. Ю., Черных С. И., Кордюм В. А. Использование мутантного фага lambda I857 Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>N<sup>r</sup> для получения клеток, лишенных профага lambda // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1985.—11.—С. 42—44.
  25. Slavchenko I. Yu., Chernykh S. I., Kordyum V. A. Use of phage lambda I857 Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>N<sup>r</sup> derivative for isolation of prophage-free cells // *Microbiologica.*—1986.—9.—С. 89—95.
  26. Chaudhury A. M., Smith G. R. A new class of *Escherichia coli* recBC mutants: implications for the role of recBC enzyme in homologous recombination // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*—1984.—81, N 24.—P. 7850—7854.
  27. Lee E. C., Hales L. M., Gumpert R. I., Gardner J. F. The isolation and characterization of mutants of the integration host factor (IHF) of *Escherichia coli* with altered, expanded DNA-binding specificities // *EMBO J.*—1992.—11, N 1.—P. 305—313.
  28. Shadel G. S., Young R., Baldwin T. O. Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744 // *J. Bacteriol.*—1990.—172, N 7.—P. 3980—3987.
  29. Jensen J. L., Susman M. A mutant of *E. coli* that restricts growth of bacteriophage T4 at elevated temperatures // *Genetics.*—1980.—94, N 2.—P. 301—325.
  30. Waghorne C., Fuerst C. R. Identification of a temperature-sensitive mutation in the *htpR*(*rpoH*) gene of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*—1985.—164, N 2.—P. 960—963.
  31. Kikuchi A., Flamm E., Weisberg R. A. An *Escherichia coli* mutant unable to support site-specific recombination of bacteriophage lambda // *J. Mol. Biol.*—1985.—183, N 2.—P. 129—140.
  32. Tessman E. S., Peterson P. K. Bacterial *rep<sup>r</sup>* mutations that block development of small DNA bacteriophages late infection // *J. Virol.*—1976.—20, N 2.—P. 400—412.
  33. Quinto M., Bender R. A. Use of bacteriophage P1 as a vector for Tn5 insertion mutagenesis // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1984.—47, N 2.—P. 436—438.
  34. Ghelardini P., Liebart J. C., Marchelli C., Pedrini A. M., Paolozzi L. *Escherichia coli* K-12 *gyrB* gene product is involved in the lethal effect of the *ligts2* mutant of bacteriophage Mu // *J. Bacteriol.*—1984.—157, N 2.—P. 665—668.
  35. Inoko H., Shidesada K., Imai M. Isolation and characterization of conditional-lethal rho mutants of *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 3.—P. 1162—1166.
  36. Lenski R. E. Two-step resistance by *Escherichia coli* B to bacteriophage T2 // *Genetics.*—1984.—107, N 1.—P. 1—7.

УДК 579.253.4:578.81 (048.8)  
Надійшла до редакції 10.03.01