

## Лизогения у фага MS2. Экспрессия MS2-специфической информации сегрегантами нестабильных трансдуцирующих фагов P1 и $\lambda$

Т. П. Перерва\*, А. Ю. Мирюта, М. И. Вудмаска, И. П. Алексеенко<sup>1</sup>

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

<sup>1</sup>Институт ветеринарной медицины УААН  
252020, Киев, ул. Донецкая, 30

---

*Генетическими методами получена группа фагов, последовательно выщепляющихся друг из друга и ведущих свое происхождение в одном случае от P1-подобной трансдуцирующей плазмиды, а в другом — от трансдуцирующего мутанта фага  $\lambda$  ( $\lambda$ -4). Хромосома последнего содержит фрагмент ДНК MS2-индуцированного мутанта *Escherichia coli*. Серологические свойства конечных фаговых вариантов свидетельствуют об экспрессии генетической информации фага MS2 и подтверждают ее присутствие в составе всех предшествующих фаговых форм.*

---

**Введение.** В предшествующих работах [1—4] нами были описаны MS2-индуцированные мутанты *Escherichia coli* AB 259 Hfr 3000 по росту и делению клетки. По сравнению с диким типом оптическая плотность жидких культур мутантных клеток нарастала в 2 раза быстрее, а переход в фазу стационарного роста происходил при более высокой плотности клеточной суспензии. У мутантов наблюдалось увеличение размеров клеток и повышенная тенденция к образованию цепочек; в отличие от клеток дикого типа мутантные клетки имели вместо одного несколько нуклеоидов.

Как известно, скорость синтеза ДНК, количество ДНК в клетках и время, необходимое для деления клетки, определяются регуляцией процессов репликации на уровне инициации [5]. Поскольку появление наблюдаемых нами мутантных признаков происходило на фоне мутаций интегрированного в хромосому *F*-фактора (от нарушения адсорбции фага MS2 до потери *F*-нитей), мы пришли к выводу о том, что наблюдаемые изменения относятся к области инициации репликации *F*-репликона.

Клонирование этой области и изучение ее в составе рекомбинантной плазмиды [3, 4] позволили предположить, что указанные изменения обусловлены возможным присутствием вставки нуклеиновой кислоты фага MS2 в виде дополнительной цепочки РНК и возникновением в этой области нестандартной структуры. Такие области инициации репликации, в состав которых входит постоянно присутствующая цепочка РНК, известны как *R*-петли и описаны для некоторых мутантов *E. coli* [6]. Существование подобного комплекса, в котором РНК-цепочка представлена фаговой РНК,

---

\*Correspondence address.

кажется интересным с нескольких точек зрения. Во-первых, это был бы еще один способ сохранения генетической информации фага в составе бактериальной хромосомы; во-вторых, в таком случае стал бы объяснимым повышенный уровень репликации, темп которой определяется частотой инициации транскрипции фаговой РНК; в-третьих, возникновение трехцепочечной структуры можно было бы связать также с нестабильностью *MS2*-индуцированных мутантов *E. coli* и выщеплением производных форм вплоть до появления мутантов, описанных нами как мутанты лизирующего типа [2].

Изучение такой необычной области инициации репликации в составе хорошо известной генетической структуры, например, хромосомы фага  $\lambda$ , имеет определенные преимущества по сравнению с рекомбинантными плазмидами, созданными на основе нереплицирующегося фрагмента [3]. К таким преимуществам относятся возможность сравнения рестрикционных карт, а также биологических признаков у производного фага и исходного фага дикого типа, включая изменение репликационных свойств и образование делеций с вероятным выщеплением новых фаговых форм. Кроме того, трансдукция мутантных признаков, индуцированных фагом *MS2*, при помощи ДНК-содержащего фага еще раз подтвердила бы возможность их связи с ДНК-содержащим геномом и явилась бы очередным свидетельством в пользу способности фага *MS2* устанавливать истинную лизогению.

Цель данного исследования — изучение возможности генетического переноса мутантной области инициации репликации из хромосомы *MS2*-индуцированного мутанта *E. coli* лизирующего типа в хромосому фага  $\lambda$ . Признаком, по которому предполагалось осуществлять контроль на присутствие интересующего нас участка клеточной ДНК, была выбрана литическая активность, обнаруженная нами впервые у *MS2*-индуцированного мутанта *E. coli* лизирующего типа. Эта активность проявляется как образование зон лизиса вокруг изолированных колоний мутанта лизирующего типа, высеянного на сплошной газон клеток еще одного *MS2*-индуцированного мутанта, названного нами ползуче-расплывающимся [2]. Согласно генетическим данным, признак литической активности сцеплен с мутантной областью инициации репликации *F*-репликона, удобен для визуального наблюдения и полностью оправдал себя при отборе рекомбинантных плазмид, сконструированных ранее на основе нереплицирующегося *Ap*-фрагмента и мутантной области инициации репликации *E. coli* Hfr 3000 [3].

В настоящей работе описана группа фагов, последовательно выщепляющихся друг из друга и ведущих свое происхождение из двух источников: непосредственно от *P1*-подобной трансдуцирующей плазмиды и от полученного нами генетическими методами фага  $\lambda$ -4, включившего в состав своей хромосомы область инициации репликации *MS2*-индуцированного мутанта *E. coli* лизирующего типа. Серологические свойства последующих фаговых сегрегантов свидетельствуют об экспрессии генетической информации фага *MS2* и подтверждают ее присутствие в составе всех предшествующих форм, начиная с промежуточной *P1*-подобной плазмиды и фага  $\lambda$ -4.

**Материалы и методы.** Использовали бактериофаги  $\lambda$ , *P1* и *MS2* дикого типа, бактериальный штамм *E. coli* AB 259 Hfr 3000 и его мутанты — ползуче-расплывающийся и лизирующий [2]. Всю работу с фагами и получение антифаговых сывороток проводили по [7], выделение нуклеиновых кислот из фагов и бактерий, выделение плазмид и рестрикционный анализ осуществляли по [8]; препараты для электронной микроскопии готовили по методу [9].

**Результаты и обсуждение.** Получение производных вариантов фага  $\lambda$ , содержащих мутантную область инициации репликации *MS2*-индуцированного мутанта *E. coli*. Получение трансдуцирующего *P1*-репликона. Поскольку мутант лизирующего типа утратил

способность адсорбировать фаг  $\lambda$  дикого типа, но сохранил чувствительность к фагу *P1*, для получения  $\lambda$ -фагов, включивших интересующую нас область хромосомы мутанта *E. coli*, использовали фаг *P1* как промежуточное звено. В связи с этим первоначальная задача состояла в создании соответствующего трансдуцирующего фага, или репликона, *P1*. Принципиальную возможность получения такого фага показали в свое время Лурия и др. [10]. Согласно их данным, фаг *P1* помимо осуществления общей трансдукции способен включать в свой геном участки бактериальной хромосомы, образуя таким образом если не инфекционный трансдуцирующий фаг, то специализированно-трансдуцирующий фаговый репликон. Эта группа исследователей описала дефектный профаг *P1dl*, у которого часть фагового генома была замещена фрагментом *lac*<sup>+</sup>. Культура клеток, несущих этот профаг, представляла собою дефектно-лизогенный штамм, иммунный к суперинфекции экзогенным гомологичным фагом.

По аналогии с этой системой нам представлялся логичным поиск культур, лизирующих клетки ползуче-расплывающегося типа, среди *P1*-устойчивых бактериальных клонов, выделенных нами из посевов фага *P1* на смешанном газоне, состоящем из клеток дикого и лизирующего типов. Смешанные газоны давали возможность вести отбор *P1*-трансдуктантов среди клеток *E. coli* 3000 дикого типа, минуя стадии получения препаратов трансдуцирующего фага и повторного заражения им бактериальной культуры. Негативные колонии фага *P1* на смешанных газонах выглядели мутными, но имели более крупные размеры, чем на обычном хозяине *E. coli* 3000, т. е. мутантные клетки, с одной стороны, участвовали в формировании фагового пятна, с другой — создавали мутный фон, обусловленный их склонностью быстро затягивать пятна лизиса за счет образования слишком плотного и до некоторой степени расползающегося роста. Однако в некоторых случаях, особенно через 3—4 пассажа, на смешанных газонах появлялись единичные пятна, более прозрачные и крупные, чем негативные колонии *P1* дикого типа. Мы предпочли выделение интересующих нас *P1*-трансдуктантов из этих прозрачных пятен, а не из мутных негативных колоний, поскольку они не были покрыты слоем роста лизирующего мутанта, мешающего дальнейшему поиску гладких колоний-трансдуктантов *E. coli* 3000. Как оказалось, по каким-то причинам прозрачные пятна не содержали инфекционного фага, но содержали бактериальные клетки, образующие при пересеве крупные колонии, более плотные по сравнению с колониями дикого типа. Исходя из того, что часть этих культур оказалась *P1*-устойчивой, мы предположили, что они могут быть лизогенными по этому фагу. Некоторые культуры сохранили *P1*-чувствительность и все культуры были чувствительными к фагу  $\lambda$ . По внешнему виду колонии, формируемые как *P1*-устойчивыми, так и *P1*-чувствительными клетками, совершенно не отличались и, кроме повышенной плотности, характеризовались также заметной слизистостью. Последняя свидетельствует о нарушении свойств клеточной оболочки и напоминает свойства слизистых штаммов, выщепившихся из колоний первично-устойчивых *MS2*-индуцированных мутантов *E. coli* 3000 [2].

Как было описано выше, колонии такого типа склонны к самолизису. Это может быть одной из причин образования прозрачных пятен в зонах обнаружения клеток *P1*-трансдуктантов, которые, скорее всего, представляют собою остатки клеток первично образовавшейся и впоследствии лизировавшейся колонии. Что касается механизма такого самолизиса, то наиболее вероятной его причиной может быть накопление литической активности того же типа, что и у лизирующего мутанта. Чтобы убедиться в этом и заодно отобрать *P1*-трансдуктанты, несущие *P1*-репликон с областью инициации репликации лизирующего мутанта, устойчивые к фагу *P1* колонии,

а также колонии, напоминающие их фенотипически, но образованные *P1*-чувствительными клетками, отсеивали в отдельные пробирки в АПБ и выращивали в течение первых суток при 37 °С, а затем несколько суток — при комнатной температуре. Для проверки литических свойств отобранных культур материал из каждой пробирки наносили петлей на свежевысеянный газон клеток ползуче-расплывающегося мутанта *E. coli* [2]. Оказалось, что многие как *P1*-устойчивые, так и *P1*-чувствительные клетки, образующие колонии слизистого типа, способны накапливать литическую активность и при нанесении на тест-газон образовывать зону лизиса вокруг зоны клеточного роста. Следует отметить, что в ходе дальнейших пересевов отобранные нами культуры теряли признак слизистости, но сохраняли способность к накоплению литической активности. Все отобранные таким образом культуры (как *P1*-устойчивые, так и *P1*-чувствительные) содержали плазмидоподобные структуры с электрофоретической подвижностью, близкой к таковой фага *P1* [11]. Электронно-микроскопический анализ показал наличие кольцевых и линейных молекул с молекулярной массой около 50 МДа.

Несмотря на то, что часть выделенных нами культур оказалась *P1*-чувствительной, т. е. *P1*-неиммунной, мы изучали их наравне с иммунными по двум причинам: 1) иммунитет к фагу *P1* у части культур могла быть обусловлена не присутствием дефектного фага, несущего часть бактериальной хромосомы, а множественной инфекцией клетки с последующей ее лизогенизацией; 2) у дефектного фага, несущего интересующий нас признак, может отсутствовать область иммунитета. Действительно, в дальнейшем оказалось, что иммунные и неиммунные клетки вели себя одинаково во всех отношениях, кроме способности инфицироваться фагом *P1*.

Получение трансдуцирующего фага  $\lambda$  по признаку литической активности, характерной для *MS2*-индуцированных мутантов *E. coli*. Следующий этап работы состоял в получении популяции фага  $\lambda$ , размноженного в клетках *P1*-трансдуктантов, и последующем отборе  $\lambda$ -рекомбинантов, несущих признак литической активности по отношению к тест-клеткам ползуче-расплывающегося мутанта. Потомство фага  $\lambda$  получали на культурах *P1*-трансдуктантов как иммунных, так и неиммунных к фагу *P1*. В качестве первого селекционирующего приема предполагался поиск в посевах потомства фага  $\lambda$  более крупных или более прозрачных негативных колоний. Основанием для этого служили предполагаемые репликативные свойства и литическая активность ожидаемых рекомбинантов.

Действительно, в препаратах фага  $\lambda$ , выращенных на культуре плотных слизистых клеток *P1*-трансдуктантов, накапливающих литическую активность, содержались инфекционные частицы. Последние формировали негативные колонии, более крупные и прозрачные, чем это свойственно фагу  $\lambda$  дикого типа. Частота возникновения этих мутантов составляла около  $1,5 \cdot 10^{-4}$ . Чтобы отобрать фаги, включившие в состав своей ДНК интересующую нас область лизирующего *MS2*-индуцированного мутанта *E. coli*, мы использовали тот же принцип тестирования литической активности на тест-клетках ползуче-расплывающегося мутанта *E. coli*. Для этого материал из нескольких прозрачных негативных колоний фага  $\lambda$  откалывали в отдельные пробирки с жидкой питательной средой, вносили в них клетки *E. coli* С600 и выращивали смесь фага с бактериями в течение нескольких суток без аэрации. Этот способ выращивания предотвращает массивный лизис зараженных клеток и способствует сохранению образовавшихся фаговых продуктов внутри клеток. Через несколько суток клеточно-фаговую суспензию тестировали спот-тестом на литическую активность в отношении клеток ползуче-расплывающегося мутанта *E. coli*. Из нескольких проверенных таким способом клонов фага  $\lambda$  мы отобрали для дальнейшей работы клон  $\lambda$ -4, образующий прозрачные негативные колонии и

накапливающий литическую активность того же типа, что и клетки лизирующего MS2-индуцированного мутанта *E. coli*.

Таким образом, нам удалось генетическими методами получить вариант фага  $\lambda$ , несущий специфический заданный признак, сцепленный с другими свойствами мутантной бактериальной клетки. Как оказалось в ходе дальнейшего изучения, фаг  $\lambda$ -4 является первичным звеном системы фаговых мутантов, аналогичной ранее описанной системе клеточных MS2-индуцированных мутантов. Помимо  $\lambda$ -4, новая фаговая система включает в себя фаг со свойствами, которые условно можно назвать слабыми ростовыми (подобно мутанту ползуче-расплывающегося типа), а также фаг со свойствами, которые можно считать сильными ростовыми (аналогично мутанту лизирующего типа).

Как и первично-устойчивый MS2-индуцированный мутант *E. coli* [1, 2], фаг  $\lambda$ -4 представляет собою нестабильную структуру, способную выщеплять производные формы, идентифицируемые как фаги с новыми физиологическими свойствами. Так, при высевах  $\lambda$ -4 на  $F^{\lambda}$ -штамм *E. coli* CR63, обычно используемый для отбора  $h$ -мутантов фага  $\lambda$ , оказалось, что в препаратах  $\lambda$ -4 содержится донор-специфичный фаг, активный по отношению к *E. coli* CR63 и образующий очень мутные негативные колонии, практически сливающиеся с бактериальным газоном. Четко установить его присутствие можно лишь путем нанесения капли фаговой суспензии в достаточно высоком титре на свежепосеянный сплошной слой бактерий. Этот фаг, названный нами P47, можно отобрать еще на одной донорской лямбда-устойчивой культуре — *E. coli* K12 ( $\lambda$ ). Для этого материал изолированной негативной колонии  $\lambda$ -4 предварительно размножали на культуре *E. coli* C600, концентрировали с использованием полиэтиленгликоля и очищали центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. Очищенный фаг высеивали на чашку двуслойным методом совместно с клетками *E. coli* K12 ( $\lambda$ ). Через сутки выращивания при 37 °С верхний слой, заросший сплошным бактериальным газоном, ресуспендировали в аминокислотном бульоне, центрифугировали и надосадочную жидкость использовали для следующего аналогичного заражения. Через несколько пассажей в надосадочной жидкости методом спот-теста можно было обнаружить фаг, лизирующий только донорские, но не реципиентные штаммы, что отличало его от фагов  $\lambda$  и  $\lambda$ vir и было общим с фагом MS2. Пассажи были продолжены до тех пор, пока этот фаг не удалось отделить от фага  $\lambda$ -4 и препарат уже не содержал инфекционных частиц, способных образовывать негативные колонии на реципиентном штамме *E. coli* C600  $F^-$ .

Как и  $\lambda$ -4, фаг P47 не является полностью стабильной структурой и спонтанно выщепляет еще одну производную форму фага, образующего крупные негативные колонии, четко различимые на фоне как бактериального газона, так и мутных посевов фага P47. В отношении круга хозяев этот фаг, названный нами P11, идентичен фагу P47 и активен только по отношению к донорским клеткам. Фаг такого же типа, названный нами P12, обнаруживается в старых культурах, в состав которых входит описанная выше P1-подобная плазмида, содержащаяся в P1-трансдуктантах *E. coli* 3000, обладающих специфической литической активностью. Это дает основание предположить выщепление фага одного и того же типа из участка хромосомы MS2-индуцированного мутанта *E. coli*, включившегося в состав ДНК фага P1, а затем  $\lambda$ .

Таким образом, описываемая в настоящей работе экспериментальная система состоит из P1-подобной плазмиды и нескольких фагов:  $\lambda$ -4, P47, P11 и P12, отличающихся от исходных фагов P1 и  $\lambda$  по тем или иным признакам.

*Основные свойства производных фагов. Фаг  $\lambda$ -4.* Как уже отмеча-

лось, в отличие от фага  $\lambda$  дикого типа, фаг  $\lambda$ -4 образует прозрачные негативные колонии, несколько более крупные, чем у исходного фага. Это свойство, как правило, связано с нарушением иммунной системы и характерно для мутантов типа *clear* и *vir*. Однако вирулентным этот фаг не является, поскольку он не способен к образованию негативных колоний на лизогенном штамме *E. coli* K12 ( $\lambda$ ). С другой стороны, рестрикционный анализ обнаруживает существенные структурные изменения в центральной части хромосомы фага  $\lambda$ -4. Согласно электрофореграммам, полученным при использовании рестриктаз *EcoRI* и *HindIII* (рис. 1), у  $\lambda$ -4 отсутствуют полосы, соответствующие фрагментам размерами 1,96 и 2,30 тыс. п. н. в случае *HindIII* и фрагменту размером 4,85 тыс. п. н. в случае *EcoRI*. Использование рестриктазы *BamHI* выявляет присутствие более легкой полосы для ДНК  $\lambda$ -4, не наблюдающейся в ДНК  $\lambda$  дикого типа. При этом обращает на себя внимание сохранность всех остальных полос, образующихся при рестрикции ДНК фага  $\lambda$  рестриктазой *BamHI*. Единственная разница состоит в уменьшении интенсивности нижней полосы, включающей *BamHI* фрагменты А и С с одинаковым размером 5,54 тыс. п. н.. Поскольку фрагмент А включает в себя гены фаговой головки, необходимые для формирования зрелой инфекционной частицы, то дополнительный *BamHI* фрагмент мог образоваться лишь за счет появления дополнительных *BamHI* сайтов в области *BamHI*-С-фрагмента, занимающего на карте  $\lambda$  промежуток между 0,468 и 0,581 (координаты в долях от длины фагового генома). Это свидетельствует о появлении замещения в этой области, так же как отсутствие *EcoRI*-В-фрагмента и *HindIII*-В- и С-фрагментов указывает на возможные замещения и делеции в области от 0,444 до 0,581 фагового генома. Этот участок захватывает слева *b2* область, несущественную для физиологических фаговых функций, а справа включает области *att* и *int*, обеспечивающие интеграцию фаговой ДНК в клеточную хромосому, что вполне объясняет прозрачность негативных колоний фага  $\lambda$ -4.

Фаг *P47*. Рестрикционный анализ фага *P47* проводили параллельно с изучением фагов *P11* и *P12*, сопоставляя результаты с данными, полученными при рестрикции ДНК фагов  $\lambda$  и  $\lambda$ -4. В отличие от фага  $\lambda$ -4, у фага *P47* наблюдается множество серьезных структурных перестроек, существенно отличающих его как от фага  $\lambda$ , так и от фага  $\lambda$ -4. Так, обработкой ДНК *P47* рестриктазами *HindIII* и *PstI* обнаруживается исчезновение некоторых крупных фрагментов и появление дополнительных сайтов *HindIII* и *PstI*, отсутствующих у фагов  $\lambda$  и  $\lambda$ -4 (рис. 2). В случае *HindIII* наблюдается исчезновение третьего тяжелого фрагмента G размером 6,66 тыс. п. н.,

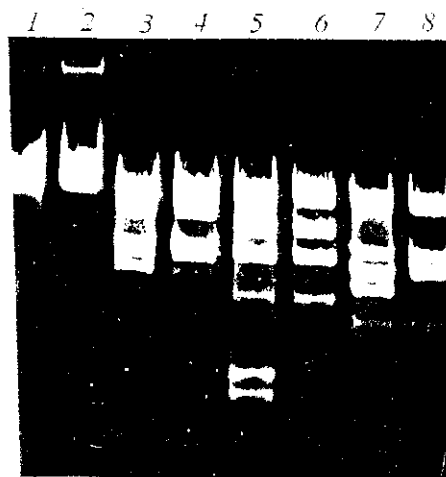


Рис. 1. Электрофореграммы ДНК фагов  $\lambda$  и  $\lambda$ -4, обработанных эндонуклеазами рестрикции: 1 — необработанная ДНК  $\lambda$ ; 2 — необработанная ДНК  $\lambda$ -4; 3 — ДНК  $\lambda$ , обработанная *BamHI*; 4 — ДНК  $\lambda$ -4, обработанная *BamHI*; 5 — ДНК  $\lambda$ , обработанная *HindIII*; 6 — ДНК  $\lambda$ -4, обработанная *HindIII*; 7 — ДНК  $\lambda$ , обработанная *EcoRI*; 8 — ДНК  $\lambda$ -4, обработанная *EcoRI*

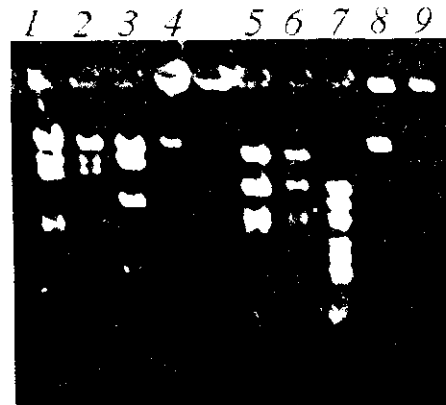


Рис. 2. ДНК фагов, обработанные эндонуклеазами рестрикции *Hind*III (1—4) и *Pst*I (5—9): 1 — ДНК  $\lambda$ ; 2 — ДНК  $\lambda$ -4; 3 — ДНК P47; 4 — ДНК P11; 5 — ДНК  $\lambda$ ; 6 — ДНК  $\lambda$ -4; 7 — ДНК P47; 8 — ДНК P11; 9 — ДНК P12

занимающего на генетической карте положение между генами *cI* и *Q*. Как известно, этот фрагмент, располагающийся в правом плече хромосомы  $\lambda$  между координатами 0,777 и 0,913, включает в себя гены *O* и *P*, контролирующие репликацию фаговой ДНК.

В случае обработки ДНК фага P47 рестриктазой *Pst*I обращает на себя внимание отсутствие первой тяжелой полосы, образующейся при расщеплении фагов  $\lambda$  и  $\lambda$ -4 в сайте 37005, что соответствует точке, которая отстоит от левого конца карты на 76,3 % длины хромосомы [14]. При этом образуется фрагмент, равный 23,7 % ДНК  $\lambda$  и включающий гены *cI*, *O*, *P*, *S* и *R*, т. е. ту же область, часть которой входит в *Hind*III-фрагмент размером 6,66 тыс. п. н.

Исчезновение некоторых тяжелых полос на электрофореграммах P47-*Hind*III и P47-*Pst*I сопровождается появлением дополнительных более легких полос, что свидетельствует не просто о делециях в соответствующих участках фаговой хромосомы, а о появлении новых сайтов рестрикции, причиной которого может быть или встраивание чужеродных фрагментов ДНК, или перестройки внутри фаговой хромосомы.

Дальнейшее изучение свойств фага P47 обнаружило, что при электрофорезе в агарозном геле его нерестрицированная ДНК располагается одной полосой, на некотором расстоянии от которой наблюдается пятно, по своему виду подобное одноцепочечной нуклеиновой кислоте. Появление этого пятна нельзя отнести за счет примеси бактериальной РНК, поскольку фаговую ДНК выделяли из препаратов фага, очищенных в градиенте плотности CsCl. Обработка препаратов РНКазой в условиях, обеспечивающих переваривание как одно-, так и двухцепочечной РНК, не вносит никаких изменений в наблюдаемую картину (рис. 3). В то же время обработка ДНК фага P47 ДНКазой параллельно с контрольной обработкой ДНК фага  $\lambda$  и РНК фага MS2 свидетельствует, о том, что и верхняя полоса и пятно, наблюдаемые при электрофорезе нерестрицированной нуклеиновой кислоты фага P47, представлены ДНК (рис. 4). Происхождение и роль одноцепочечной ДНК P47 пока что непонятны, однако можно предположить, что она входит в некий нестабильный участок в составе ДНК P47 и связана, с одной стороны, с особенностями биологии этого фага, в том числе со сложностями плякообразования, а с другой — с регулярным выщеплением из его популяции фага P11. Сопоставление свойств фагов P11 и P12 обнаруживает сильное сходство их физико-химических и биологических характеристик.

Ф а г и P11 и P12. Ниже приведены результаты рестрикционного изучения ДНК фагов P11 и P12 в сравнении с ДНК фагов  $\lambda$ ,  $\lambda$ -4 и P47. Как можно видеть на рис. 2, ДНК фагов P11 и P12 не рестрицируется

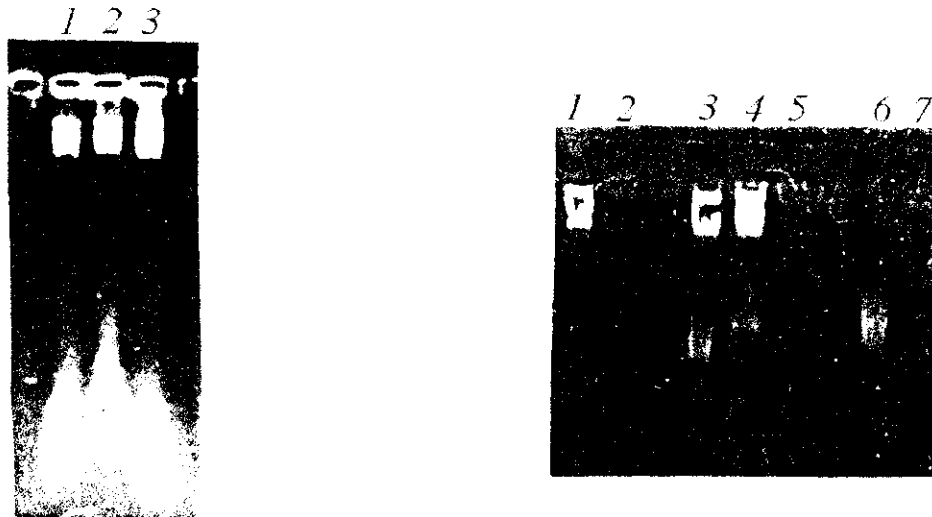


Рис. 3. ДНК фага *P47*: 1 — необработанная РНКазой в 20×SSC; 2 — обработанная РНКазой в 20×SSC; 3 — обработанная РНКазой в 1×SSC

Рис. 4. Нуклеиновые кислоты фагов, необработанные и обработанные ДНКазой и РНКазой: 1 — необработанная ДНК  $\lambda$ ; 2 — ДНК  $\lambda$ , обработанная ДНКазой; 3 — необработанная ДНК *P47*; 4 — ДНК *P47*, обработанная РНКазой; 5 — ДНК *P47*, обработанная ДНКазой; 6 — необработанная РНК *MS2*; 7 — РНК *MS2*, обработанная РНКазой

рестриктазами *HindIII* и *PstI*. Кроме того, ДНК этих фагов не рестрицируется также рестриктазой *BamHI* (данные не представлены). В то же время рестриктаза *HaeIII* (рис. 5) расщепляет ДНК *P11* и *P12* на значительное число фрагментов, расположение которых позволяет рассматривать эти фаги как идентичные. В отличие от ДНК *P47* при электрофорезе нерестрицированных ДНК *P11* и *P12* мы ни разу не наблюдали появления пятна, соответствующего одноцепочечной нуклеиновой кислоте. Это обстоятельство коррелирует с нормальным плякообразованием у фагов *P11* и *P12*, образующих хорошо различимые негативные колонии. Следует отметить также, что негативные колонии, образуемые этими фагами, отличаются от таковых остальных известных фагов способностью увеличиваться в течение нескольких дней за счет образования более или менее мутных ореолов, на распространение которых не влияет естественное старение бактериального газона (рис. 6). Эта особенность плякообразования демонстрирует репликативные способности и урожай фага, в определенной степени аналогичные репликативным способностям и ростовым характеристикам мутанта лизирующего типа *E. coli* 3000.

Электронно-микроскопическое изучение фагов *P11* и *P12* показало, что в этом отношении они также неотличимы друг от друга и представляют собой вирионы, состоящие из головки и хвостового отростка (рис. 7).

*Серологические свойства фагов P11 и P12.* Оба фага инактивируются анти*MS2*-сывороткой в такой же степени, как и фаг *MS2*, и ни один из них не инактивируется ни анти $\lambda$ -, ни анти*P1*-сывороткой, несмотря на то, что фаг *P11* выщепился из ДНК фага *P47*, ведущего свое происхождение от фага  $\lambda$ -4, а фаг *P12* выщепился из *P1*-подобной специализированно-трансдуцирующей плазмиды, описанной выше (таблица). Приведенный факт позволяет предположить, что оба фага представляют собой продукты выщепления из одной и той же последовательности ДНК мутанта лизирующего типа, включенной в одном случае в состав ДНК фага  $\lambda$ , в другом — в состав ДНК фага *P1*. Первичный эффект такого включения состоит,



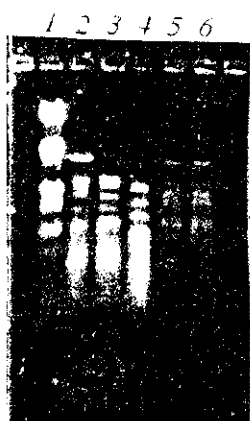


Рис. 5. ДНК фагов, обработанные рестриктазой *HaeIII* (2--6): 1 — ДНК фага  $\lambda$ , обработанная *EcoRI+HindIII* (маркер); 2 — ДНК фага  $\lambda$ ; 3 — ДНК фага  $\lambda$ -4; 4 — ДНК фага *P47*; 5 — ДНК фага *P11*; 6 — ДНК фага *P12*

Рис. 6. Негативные колонии фага *P11*



Рис. 7. Электронная микрофотография фага *P11*

*Инактивация исходных и производных фагов специфическими антифаговыми сыворотками*

Фаж	Контроль (не обработанный антисывороткой)	Число негативных колоний после обработки анти-сывороткой к фагам			Инактивация после обработки <i>MS2</i> -антисывороткой, %
		$\lambda$	<i>P1</i>	<i>MS2</i>	
$\lambda^T$	539	2	532	516	0
$\lambda$ -4	181	0	208	190	0
<i>P1</i>	1800	1780	270	1729	0
<i>MS2</i>	201	195	214	41	79,6
<i>P11</i>	926	911	870	276	79,2
<i>P12</i>	210	234	219	37	87,1

очевидно, в появлении делеций в прилегающих участках фаговых ДНК, что обнаруживается у фагов  $\lambda$ -4 и *P47* при рестрикционном анализе, а у фага *P1* — как возникновение *P1*-подобной плазмиды и отсутствие образования жизнеспособного фага *P1* в клетках, содержащих эту плазмиду. Инактивация фагов *P11* и *P12* анти*MS2*-сывороткой свидетельствует о присутствии в нуклеиновой кислоте этих фагов *MS2*-подобной последовательности, хотя

форма ее существования и механизмы экспрессии в составе ДНК фагов *P11* и *P12* еще непонятны.

Тем не менее, сама по себе упаковка зрелых частиц этих фагов белком оболочки *MS2* предполагает присутствие в их геноме *MS2*-специфической последовательности в виде фаговой РНК. Как было показано в работе Пикета и Пибоди [15], белок оболочки фага *MS2* способен упаковывать в вирусоподобную частицу даже гетерологичную РНК, но при условии, что она связана хотя бы с фрагментом РНК *MS2*, содержащим сайт связывания белка оболочки, который в дополнение к своей роли генетического регуляторного элемента может функционировать так же, как сигнал упаковки (*pac*). Поскольку фаги *P11* и *P12* сами осуществляют синтез своей оболочки, то присутствующая в их геноме РНК *MS2* явно длиннее 21 нуклеотида, составляющего *pac*-последовательность.

Таким образом, появление фагов нового типа (*P11* и *P12*), инактивирующихся анти-*MS2*-сывороткой, т. е. упакованных в белок оболочки фага *MS2*, но отличающихся от исходного фага *MS2* типом и свойствами нуклеиновой кислоты, а также особенностями плякообразования, позволяет предположить присутствие и экспрессию в ДНК-содержащем геноме *MS2*-специфической информации в виде РНК-содержащей, а не ДНК-содержащей протяженности.

Изучение механизмов этой взаимосвязи в рамках описанной нами генетической системы обеспечивает еще один экспериментальный подход для дальнейшего понимания взаимодействия РНК- и ДНК-содержащих геномов на разных уровнях организации живой природы.

Работа поддержана государственным фондом фундаментальных исследований Государственного комитета по вопросам науки и технологий.

*Т. П. Перерва, Г. Ю. Мирюта, М. И. Вудмаска, И. П. Алексеевко*

Лізогенія у фага *MS2*. Експресія *MS2*-специфічної інформації сегрегантами нестабільних трансдукуючих фагів *P1* і  $\lambda$

#### Резюме

*Генетичними методами одержано групу фагів, які послідовно вищеплюються один з одного і мають походження з двох джерел — від *P1*-подібної трансдукуючої плазміди та від трансдукуючого мутанта фага  $\lambda$  ( $\lambda$ -4). Хромосома останнього містить фрагмент ДНК *MS2*-індукованого мутанта *Escherichia coli*. Серологічні властивості кінцевих фагових варіантів свідчать про експресію генетичної інформації фага *MS2* і підтверджують її присутність у складі всіх передуючих фагових форм.*

*T. P. Pererva, A. J. Miriuta, M. I. Woodmaska, I. P. Alekseenko*

Lyzogeny by *MS2* phage. Expression of *MS2*-specific information with segregants of unstable transducing *P1*- and  $\lambda$  phages

#### Summary

*Using genetical methods the group of phages segregating in succession from each other was obtained. In one case these phages originate from *P1*-like transducing plasmid and in another case — from transducing  $\lambda$ -phage mutant ( $\lambda$ -4), integrated DNA-fragment of *E. coli* *MS2*-induced mutant. Serological properties of final phage variants demonstrate *MS2* phage genetical information expression and appear to be evidence of its presence in the structure of all precedent phage forms.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Перерва Т. П. Устойчивость к фагу *MS2*, индуцированная у *E. coli* при заражении этим фагом // Цитология и генетика.—1977.—11, № 1.—С. 3—9.
2. Перерва Т. П., Мальюта С. С. Система *MS2*-индуцированных мутантов *E. coli* по

- F-фактору // Молекулярная биология.—1984.—Вып. 38.—С. 81—90.
3. *Перерва Т. П., Мирюта Н. Ю., Мирюта А. Ю.* Лизогения у фага MS2. Синтез фагоспецифичной РНК на клеточной ДНК // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 1.—С. 45—50.
  4. *Pererva T. P., Miriuta N. J., Miriuta A. J. et al.* Lysogeny by MS2 phage. Analysis of a recombinant plasmid containing MS2 RNA-like sequence // Там же.—1995.—11, № 1.—С. 61—65.
  5. *Zyskind J. W., Smith D. W.* DNA replication, the bacterial cell cycle, and cell growth // Cell.—1992.—69.—P. 5—8.
  6. *Asai T., Kogota T.* D-loops and R-loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1994.—176, N 7.—P. 1807—1812.
  7. *Адамс М.* Бактериофаги.—М.: Изд-во иностр. лит., 1961.—527 с.
  8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д.* Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—497 с.
  9. *Davis R. W., Simon M., Davidson N.* Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids // Meth. Enzymol.—1971.—21, pt D.—P. 413—428.
  10. *Luria S., Adams J., Ting R.* Transduction of lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles // Virology.—1960.—12, N 2.—P. 348—390.
  11. *Перерва Т. П., Бух И. Г., Мартынов С. А., Малыта С. С.* Передача признаков нарушенного роста, деления и функциональных свойств мембран и оболочки кишечной палочки другим штаммам при помощи P1-подобной плазмиды и трансдуцирующих фагов  $\lambda$  и P1 // Молекуляр. биология.—1984.—Вып. 38.—С. 90—95.
  12. *Zane D., Hill D., Canghey P. Gunn.* The mini-F-primary origin. Sequence analysis and multiple activities // J. Mol. Biol.—1984.—180, N 2.—P. 267—282.
  13. *Перерва Т. П., Бух И. Г., Даниленко Т. С., Мартынов С. А.* Свойства трансдуцирующего фага  $\lambda$ -4 // Вирусы и вирус. заболевания.—1988.—Вып. 16.—С. 46—49.
  14. *Daniels D. I., Schroeder J. I., Szybalski W., Blathner F. R.* A molecular map of bacteriophage lambda // Genetic Maps.—1982.—2.—P. 1—9.
  15. *Pickett G. G., Peabody D. S.* Encapsulation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein // Nucl. Acids Res.—1993.—21, N 19.—P. 4621—4626.