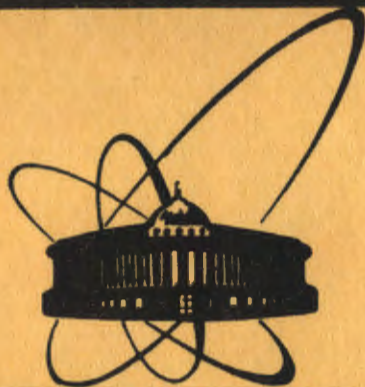


87-791



**СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА**

*Б 812*

P19-87-791

**М.Н.Бонев, С.Козубек**

**ОЧИСТКА ЛИЗОГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ  
ОТ СВОБОДНОГО ФАГА  
ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ИНДУКЦИИ ПРОФАГА  $\lambda$   
ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ**

**1987**

Известно, что ключевую роль в специфике летального и мутагенного действия излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) на клетки играет индуцибельная SOS-репарация. Одним из способов регистрации SOS-ответа клеток является определение индукции профага у лизогенных бактерий. Изучение закономерностей индукции бактериофага  $\lambda$ , начатое в 50-х годах<sup>/1-4/</sup>, проводилось главным образом с использованием ультрафиолетовых (УФ) лучей, а позднее рентгеновских и  $\gamma$ -лучей. Тогда же были разработаны и методики для титрования свободного фага (СФ) с использованием стрептомициновой техники<sup>/2/</sup>, а также методы титрования инфекционных центров (ИЦ) с применением антифаговой сыворотки<sup>/3/</sup>. Имеющиеся в литературе данные о характере зависимости СФ и ИЦ от дозы электромагнитных излучений указывают на то, что в широком диапазоне доз эта зависимость описывается кривой с максимумом<sup>/4-6/</sup>. До последнего времени работы по исследованию закономерностей индукции профага  $\lambda$  плотнойонизирующими излучениями не проводились.

Постановка экспериментов по облучению лизогенных бактерий *Escherichia coli* на ускорителях тяжелых ионов низких энергий сопряжена с определенными трудностями методического характера. Учитывая это, мы разработали методику, позволяющую выявлять лизогенные клетки, вступившие в литический цикл развития, при действии излучений с различными ЛПЭ в широком диапазоне доз облучения.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали следующие штаммы бактерий *Escherichia coli*: HfrH, W3110, P3478, GC244, JC5491, Cstr<sup>R</sup>, Ay( $\lambda$ ). Штамм Cstr<sup>R</sup> использовали как индикаторный, а Ay( $\lambda$ ) - в качестве донора фага дикого типа при лизогенизации остальных штаммов.

Культуру клеток (лизогенный и индикаторный штаммы) инкубировали в жидкой питательной среде (мясо-пептонный бульон производства Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалея Министерства здравоохранения СССР) в течение 16 ч при 37°C до стационарной фазы ( $2-4 \cdot 10^8$  клеток/мл). Затем клетки переносили в 10 мл

свежей питательной среды при разведении 1:20 и снова инкубировали в течение 3-х ч при 37°C до достижения экспоненциальной фазы роста ( $3-7 \cdot 10^8$  клеток/мл) культуры. Последующие этапы работы включали центрифугирование в течение 15 мин (8000 g) и ресуспендирование осадка двух пробирок в 1 мл  $10^{-2}$ М раствора  $MgSO_4$ . После этого отбирали 1 мл клеточной суспензии, фильтровали через стерильные лавсановые ядерные фильтры диаметром 18 мм (диаметр пор 0,5 мкм) и промывали 1 мл дистиллированной воды. Фильтры ставили на специальную подложку, впитывающую в себя проходящую через поры фильтра воду, низкомолекулярные соединения и бактериофаги. Оставшиеся бактериальные клетки смывали с поверхности фильтра встряхиванием в 1 мл  $10^{-2}$ М раствора  $MgSO_4$ .

Облучение клеток  $\mu$ -лучами проводили на установке с  $\mu$ -источником  $^{137}Cs$ , мощностью дозы облучения 35 Гр/мин. Клетки облучали на поверхности ядерных фильтров, расположенных на поверхности мясо-пептонного агара (МПА) производства института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи МЗ СССР, приготовленных в форме цилиндров с диаметром 12 мм и высотой 2-3 мм в чашках Петри.

Для облучения клеток на ускорителе многозарядных ионов фильтры помещали на МПА, разлитый в специально изготовленные металлические чашки. На поверхность фильтра микропипеткой наносили суспензию клеток объемом 0,01 мл. Облучение проводили через 20-30 мин после подсыхания поверхности фильтров.

После облучения клетки смывали с поверхности фильтров встряхиванием в 2 мл  $10^{-2}$ М раствора  $MgSO_4$ . Суспензию облученных клеток разводили в  $10^{-2}$ М раствора  $MgSO_4$  и рассеивали на чашках Петри, содержащих 15 мл МПА с добавлением 3 мл/л одномолярного раствора  $MgSO_4$ .

Посев клеток проводили двумя способами: для определения выживаемости методом микроколоний использовали стандартную методику, а для определения ИЦ чашки Петри заливали 3 мл верхнего агара (10 г пептон, 1 г дрожжевой экстрат, 8 г NaCl, 7 г агар - на 1 л  $H_2O$  с добавлением 3 мл/л 1М раствора  $MgSO_4$  после автоклавирования) при температуре 44°C вместе с 0,1 мл культуры индикаторного штамма. Для титрования СФ перед заливкой чашек в пробирки с приготовленным для заливки верхним агаром добавляли 2 мг/мл стрептомицина.

Чашки с клетками инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Частоту индукции ( $f_1$ ) определяли как отношение выявленных негативных колоний (НГ) ( $N_1$ ) при титровании ИЦ на количество образующихся колоний необлученной культуры ( $N_0$ ):  $f_1 = N_1/N_0$ .

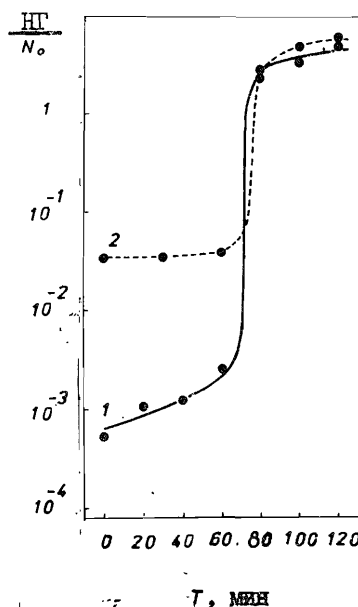
Полученные результаты подвергали статистической обработке на ЭЭМ. Ошибки относительных величин определяли из наибольшей ошибки любой из остающихся величин, полученных в параллельных экспериментах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как известно, в 1951 г. Бертани<sup>2/</sup> предложил метод для титрования СФ с использованием стрептомицина. Антибиотик, убивая лизогенные клетки, предотвращает возникновение НГ вследствие спонтанной индукции профага в течение суточной инкубации клеток. При титровании ИЦ степень инактивации лизогенных клеток таким способом недостаточна, поскольку НГ могут образоваться от наличия свободных фаговых частиц, всегда присутствующих в лизогенных культурах. Для того чтобы снизить фон вирусных частиц, Маркович<sup>3/</sup> разработал метод с использованием антифаговой сыворотки. Последняя инактивирует до 90% СФ в течение 10 мин, что является недостаточным при определении малой степени индукции профага. Работа с антифаговой сывороткой связана и с определенными техническими неудобствами, заключающимися в необходимости завершать все манипуляции до окончания латентного периода (период созревания и выброс нового фагового потомства). Кроме того получение антифаговой сыворотки является длительной и трудоемкой процедурой.

С учетом указанных выше недостатков метода нами был разработан метод очистки лизогенной культуры от бактериофага с помощью лавсановых ядерных фильтров. Данный метод позволяет снизить уровень фоновой концентрации СФ больше, чем на два порядка: с  $(2,2 \pm 0,6) \cdot 10^5$  на  $(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^3$  фаговых частиц на мл.

Рис.1. Зависимость выхода НГ от времени пострадиационной инкубации клеток *E. coli*: Hfn( $\lambda$ ) при дозе облучения 210 Гр. По оси абсцисс - время, мин; по оси ординат - выход НГ, 1 - плюс стрептомицин, 2 - без стрептомицина.



На рис.1 представлен выход НГ с использованием стрептомицина и без него, в зависимости от времени инкубации при 37°C после облучения до рассева культуры на чашках Петри. Видно, что кривая 1 начинается значительно ниже, чем кривая 2, что обусловлено снижением количества СФ частиц. При этом на кривой 2 наблюдается хорошо оформленное плато (латентный период). Разница между начальными участками двух кривых примерно такая же, как и при снижении фоновой концентрации СФ, составляющая

около двух порядков. По-видимому, антибиотик препятствует оформлению НГ из индуцированных клеток, т. е. НГ на кривой I являются результатом инфекции чувствительных клеток только новыми фаговыми частицами. Сходные результаты получены и в работе /4/.

Выход НГ во время латентного периода на кривой 2 определяет количество лизогенных клеток, вступивших в литический цикл развития. В связи с этим возникает вопрос об оценке той доли НГ, которые возникают вследствие спонтанной индукции бактериофага в течение суточного инкубирования культуры. С этой целью мы определили частоту возникновения спонтанных НГ ( $f_s$ ) как отношение числа НГ, без использование стрептомицина ( $N_{is}$ ), на число выявленных жизнеспособных колоний в необлученной культуре ( $N_0$ ):  $f_s = N_{is}/N_0$ . Число рассеиваемых лизогенных клеток при этом выбирали так, что вероятность возникновения НГ от СФ была бы пренебрежимо мала. В результате этого было получено, что величина  $f_s$  на 1-2 порядка меньше частоты индукции  $f_i$  для любого лизогенного штамма в диапазоне используемых доз облучения.

На рис.2 представлена дозовая зависимость величины  $f_i$  для штамма HfrH( $\lambda$ ) и кривые выживания клеток E.coli HfrH( $\lambda$ ) при облучении ионами гелия с ЛПЭ 22 кэВ/мкм.

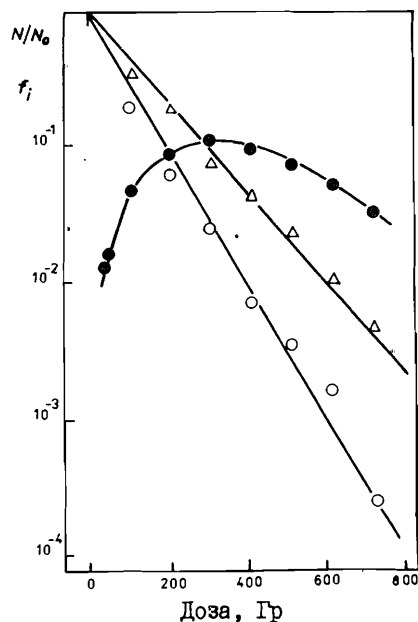


Рис.2. Дозовая зависимость частоты индукции профага  $\lambda$  (●) и кривые выживания клеток E.coli HfrH( $\lambda$ +) (○) и HfrH( $\lambda$ -) (△). По оси абсцисс - доза облучения, Гр, по оси ординат - выживаемость и частота индукции.

Видно, что кривые выживания для обоих штаммов экспоненциальны. Дозовая зависимость представляет собой кривую с максимумом.

Таким образом, разработанная нами методика позволяет выявить ИЦ при малой степени индукции профага  $\lambda$  и тем самым исследовать зависимость  $f_i$  в широком диапазоне доз.

Облучение клеток бактерий на лавсановых ядерных фильтрах позволяет сопоставлять результаты индуцибельного действия излучений разного качества.

Авторы выражают благодарность М.В.Тарасян за любезно предоставленные бактериальные штаммы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. A.Lwoff., L.Siminovich., N.Kjeldgaard, - Ann.Inst.Pasteur, 1950, v. 79, p. 815-859.
2. G.Bertany, - J.Bact., 1951, No.3, v. 62, p. 301-318.
3. H.Marcovich, - Nature, 1954, v. 174, p. 796-797.
4. H.Marcovich, R.Latarget, - Adv. in Biol.Med.Physics, 1958, v. 6, p. 75-94.
5. S.C.West, K.A.Powell, P.T.Emmerson, - Mol.gen.Genet., 1975, v. 141, p. 1-8.
6. R.E.S.Carvalho, A.C.Leitao, - Photochemistry and Photobiology, 1984, v. 39, p. 619-623.

Рукопись поступила в издательский отдел  
4 ноября 1987 года.

Бонев М.Н., Козубек С.

P19-87-791

Очистка лизогенной культуры бактерий от свободного фага при исследовании индукции профага  $\lambda$  ионизирующими излучениями

Предлагается метод очистки лизогенной культуры бактерий от свободного фага /СФ/ с использованием лавсановых ядерных фильтров. Данный метод позволяет снизить фон СФ на два порядка и тем самым исследовать индукцию профага  $\lambda$  в широком диапазоне доз при действии ионизирующих излучений на клетки.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод М.И.Потапова

Bonev M.N., Kozubek S.

P19-87-791

A Separation of a Lysogenic Bacterial Culture from the Free Phage in Prophage  $\lambda$  Induction Study by Ionizing Rays

A method of a lysogenic bacterial culture separation from the free phage (FP) by using Dacron nuclear filters has been proposed. This method permits one to reduce the background of FP about two orders of magnitude and furthermore to study prophage  $\lambda$  induction of *E. coli* cells irradiated by ionizing rays in a large dose range.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987