

М. Г. ОГАНЕСЯН, Э. Г. МУГНЕЦЯН

ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ У ЯНТАРНОГО МУТАНТА am B22 БАКТЕРИОФАГА T4D

Подавляющее большинство химических мутагенов, широко применяемых в генетических и селекционных работах, относится к группе алкилирующих агентов [3]. Целенаправленное и осознанное применение этих мутагенов требует детального знания механизмов их инактивирующего и мутагенного действия. Задача настоящей работы—изучить некоторые стороны этого вопроса.

Материалы и методы. Среда: твердый питательный агар: пептон (spofa)—10; NaCl—5, глюкоза—4; аминокислота—100, агар—12, H₂O—до 1 литра. Полужидкий агар: пептон (spofa)—10; NaCl—5, глюкоза—4; аминокислота—500, агар—7; H₂O—до 1 литра.

Бактериофаги: В работе использовался янтарный мутант amB22 фага T4 (получен от Р. Эдгара).

Бактерии: В качестве рестриктивного штамма использовался *E. coli* B (получен от С. Бензера), в качестве пермиссивного штамма—*E. coli* CR63.

Мутагенизация препаратов фага. Суспензия фага amB22 разводилась в бикарбонатном буфере (рН=7,3), инкубировалась при 37°C в течение 5 мин. и в этой смеси разбивалась ампула с диэтилсульфатом (ДЭС) из расчета конечной концентрации мутагена 0,17 М. Смесь инкубировалась дальше при 37°C, при постоянном перемешивании, через определенные сроки отбирались пробы и переносились в инактивирующий раствор тиосульфата натрия (после предварительных опытов была выбрана оптимальная концентрация тиосульфата натрия=26,0%) для прекращения действия мутагена. Соответствующие разведения высевались на газоны пермиссивного и рестриктивного штаммов для определения степени инактивации и мутагенизации.

Инактивация. Степень инактивации фага устанавливалась определением титра фаговой суспензии до и после обработки мутагеном методом агаровых слоев [1], на пермиссивном штамме *E. coli* CR63.

Мутации: Частота встречаемости реверсий типа am → am⁺ определялась после *in vitro* обработки препаратов фага мутагеном, с последующим непосредственным высевом на рестриктивный штамм *E. coli* B. Индекс реверсий определялся из сравнения титров фага на рестриктивном и пермиссивном штаммах. Эффективность разных доз мутагена выражалась в частотах встречаемости ревертантов, отнесенных на 10⁷ испытанных частиц фага.

Результаты экспериментов и обсуждение. В предварительных экспе-

риментах были выбраны концентрация мутагена, продолжительность экспозиций, оптимальные условия обработки мутагеном (значение pH буфера), способ прекращения действия мутагена (раствор тиосульфата натрия в концентрации 26%) и др.

В выбранных условиях проводилась обработка препарата фага (в титре $\sim 10^{12}$) ДЭС в концентрации 0,17 М, при продолжительности экспозиций от 2 до 30 мин. с последующим определением числа жизнеспособных фаговых частиц на пермиссивном штамме *E. coli* CR-63 и частоты встречаемости ревертантов на рестриктивном штамме *E. coli* В. Результаты пяти типичных опытов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Мутагенное действие ДЭС (0,17 М в бикарбонатном буфере pH = 7,3) на бактериофаг Т4 Д (время в мин).

	0,0 контроль		2		4		6		10		30	
	Всего проверено частиц фага ($\times 10^8$)	Обнаружено мутаций	Всего проверено частиц фага ($\times 10^8$)	Обнаружено мутаций	Всего проверено частиц фага ($\times 10^8$)	Обнаружено мутаций	Всего проверено частиц фага ($\times 10^8$)	Обнаружено мутаций	Всего проверено частиц фага ($\times 10^8$)	Обнаружено мутаций	Всего проверено частиц фага ($\times 10^8$)	Обнаружено мутаций
	1,90	39	1,34	32	1,04	42	0,96	45	0,58	50	0,04	140
	1,85	31	1,32	38	1,27	47	1,18	45	0,80	43	0,01	105
	1,79	30	1,35	40	1,10	43	1,08	46	0,90	48	0,05	135
	1,78	28	1,25	35	1,10	39	1,08	46	0,90	—	—	—
	1,78	27	1,25	33	1,10	38	1,08	43	0,90	—	—	—
Среднее	1,82	31	1,30	35	1,10	41	1,07	45	0,76	47	0,03	126

Как видно из таблицы, ДЭС может индуцировать мутации $am^- \rightarrow am^+$ при *in vitro* обработке бактериофага. Следует особо заметить, что отмечается не только возрастание относительной доли ревертантов после мутагенизации (отнесенное к числу выживших жизнеспособных фаговых частиц), но и абсолютное возрастание числа ревертантов в штоте от менее чем 40 в контроле до 140 в опыте. Соразмерно с дозой мутагена отмечается постепенное возрастание числа ревертантов am^+ типа в препарате.

Средние данные нескольких опытов по определению степени инактивации, частоты встречаемости реверсий $am^- \rightarrow am^+$ типа в расчете на 10^7 жизнеспособных частиц бактериофага, индексов реверсий и эффективности мутагенизации при разной продолжительности экспозиции мутагена приведены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, по мере увеличения продолжительности экспозиции отмечается снижение числа жизнеспособных частиц фага в штоте с одновременным возрастанием частоты встречаемости частиц фага, претерпевших реверсии от янтарной мутации к дикому типу. При инактивации $\sim 99\%$ фаговых частиц, частота встречаемости ревертан-

Т а б л и ц а 2

Эффективность действия ДЭС на янтарный мутант ам В22 при разной продолжительности экспозиции

Продолжительность экспозиции (в мин.)	Выживаемость в %	Всего обнаружено мутаций	Частота встречаемости мутаций на 10^7 жизнеспособных частиц	Индекс реверсий $\times 10^7$	Эффективность мутагенизации
0	100,0	333	1,7	1,9	1,0
2	75,0	364	2,6	2,7	1,5
4	63,0	437	3,7	3,8	2,1
6	58,0	568	4,2	4,0	2,4
10	41,7	582	6,1	6,2	3,6
20	25,2	1445	11,4	30,6	6,7
30	1,7	380	407,0	410,0	238,0

тов достигает 407 при значении 1,7, перед мутагенизацией. При этом индекс реверсий составляет 410, при 1,9 в контроле. В этих условиях эффективность мутагенизации, оцененная по соотношению частот реверсий в опыте и контроле, составляет 238, т. е. при гибели 99% фаговых частиц частота встречаемости ревертантов ам⁺ среди 1% выживших жизнеспособных фагов в 238 раз превосходит контрольный уровень.

Реконструкционный эксперимент показал, что во всех четырех проверенных случаях спонтанные ревертанты более чувствительны к ДЭС, чем исходный ам В22, что исключает стихийный отбор предшествующих мутантов (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Результаты реконструкционного эксперимента с четырьмя спонтанными ам⁺ ревертантами

Смесь фагов ам В22 и ам ⁺	На газоне	До обработки мутагеном			После обработки мутагеном		
		выросло фагов		соотношение В/CR 63	выросло фагов		соотношение В/CR 63
		в 4 разведении	в 5 разведении		в 1 разведении	в 3 разведении	
I	В CR-63	300 —	— 1400	1:47	0 —	0 457	<1:50.000
II	В CR-63	108 —	— 1610	1:146	0 —	0 457	<1:50.000
III	В CR-63	290 —	— 1880	1:65	0 —	0 482	<1:50.000
IV	В CR-63	74 —	— 1660	1:208	0 —	0 590	<1:50.000

В настоящее время общепринятыми считаются развитые Э. Фризом представления о том, что спонтанные и индуцированные мутации являются следствием изменений чередования оснований в молекулах нуклеиновых кислот [5, 6, 15]. Фриз отмечает 4 типа таких изменений: простые

и сложные замены (или соответственно транзиции и трансверсии), выпадения (делеции), вставки (включения) и инверсии [6]. Вне зависимости от типов изменений требуется по меньшей мере один (чаще больше) акт редупликации нуклеиновых кислот для «установления» мутаций [6].

В наших экспериментах использован янтарный мутант фага T4D. Он обладает двумя весьма существенными для обсуждаемого случая особенностями. Во-первых, ам В22—янтарный мутант, это означает, что в мутационном сайте он несет триплет ЦТА (соответствующий триплет в молекуле информационной РНК будет УАГ), который не имеет «аминокислотного смысла» [10, 19] и поэтому на месте такого «бессмысленного» кодона синтез кодируемого белка, по-видимому, прерывается [9]. Во-вторых, ам В22 несет янтарную мутацию в гене, контролирующем синтез ДНК-полимеразы, фермента, без которого редупликация ДНК невозможна [14, 28].

Представленные в экспериментальной части результаты показывают, что под действием алкилирующего агента ДЭС у янтарного мутанта ам В22 можно индуцировать реверсии в условиях, когда, по-видимому, редупликация ДНК исключается. Действительно, после обработки мутагеном *in vitro* фаг помещается в клетки рестриктивного штамма *E. coli* В. В этом штамме развитие фага, которое начинается с редупликации фаговой ДНК, может идти только после осуществления реверсии к дикому типу, так как редупликация ДНК возможна лишь при наличии «нормальной» молекулы ДНК—полимеразы. Между тем, у ам В22 янтарная мутация поразила именно ДНК—полимеразный ген, поэтому синтез «нормальных» молекул фермента возможен лишь после того, как обратная мутация «исправит» мутационное повреждение в молекуле гена.

В настоящее время накоплено много данных об индукции тем или иным фактором мутаций у фагов [2, 8, 16, 20], бактерий [20], дрозофилы [18] и др. в условиях, когда редупликация гена видимо исключена.

Попытка объяснить случаи возникновения мутаций в «старом» (исходном) гене была сделана Меллером с соавторами [18]. Возникновение индуцированных алкилирующими агентами мутаций в «старом» гене дрозофилы ими объяснялось ротацией (вращением вокруг оси ДНК на 180°) оснований в молекуле ДНК. Однако остается невыясненным, поддержит ли эта гипотеза критику с точки зрения современных физико-химических представлений о структуре ДНК.

Представляет собой интерес получение реверсий типа ам $\rightarrow$ ам + именно под действием ДЭС. В настоящее время в большинстве работ [4—7] указывается, что алкилирующие агенты индуцируют мутации благодаря реакции с гуанином в молекуле ДНК. Такой алкилированный гуанин «вымывается» из ДНК, оставляя за собой «брешь». При редупликации такой «депуризированной» ДНК в комплементарной нити напротив образовавшейся «бреши» с равной вероятностью может включиться любое из 4 оснований, либо не включится никакое основа-

ние. Генетические последствия депуринизации ДНК представлены на схеме (рис. 1).

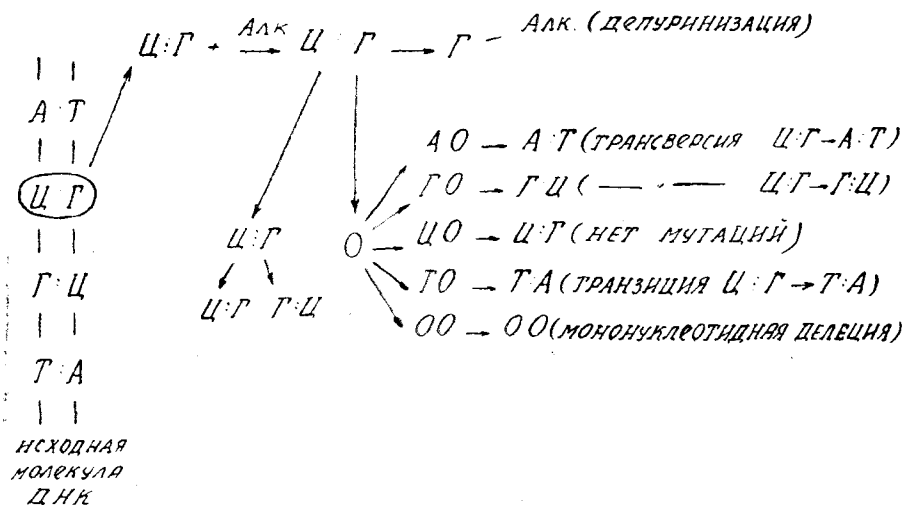


Рис. 1. Генетические последствия депуризации алкилированной ДНК.

Однако, как указывалось выше, ам В22 в мутационном сайте несет янтарный триплет ЦТА, т. е. не содержит гуанина. Между тем, у ам В22 алкилирующий агент ДЭС вызывает реверсии. По данным химических исследований, алкилирующие агенты реагируют не только с гуанином (по N₇), но и с аденином (по N₁ и заметно меньше по N₃ или по N₁ и N₃ одновременно) и незначительно с цитозином [11, 12]. Так как алкилирующие агенты с тиминном не реагируют, а с цитозином реагируют слабо и только при высоких концентрациях, то из янтарного триплета ЦТА, по-видимому, именно аденин ответствен за мутации, индуцированные ДЭС-ом. О возможном участии аденина в мутационном процессе, индуцированном алкилирующими агентами, свидетельствуют и косвенные данные Крига и Лёббека, основанные на реверсном анализе г-мутаций [17]. Вывод о необходимости пересмотра наших представлений о неизбежности редупликации ДНК для «установления» всех типов мутаций и о действии алкилирующих агентов через реакцию с аденином подтверждается и другими экспериментами.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР,
лаборатория молекулярной генетики,
Ереванский государственный университет,
Кафедра генетики и цитологии

Поступило 27.VI 1967 г.

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Է. Գ. ՄՈՒՂՆԵՑՅԱՆ

**ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՆ T4D ԲԱԿՏԵՐԻՈՖԱԳԻ ՍԱԹԵ
ՄՈՒՏԱՆՏ am B22-ի ՄՈՏ**

Ա մ փ ո փ ո լ մ

T4D բակտերիոֆագի ԴՆԹ-պոլիմերազային գենի սաթե մոտանտ am B22-ի մոտ ակիլացնող ազենտ դիէթիլ սուլֆատի ազդեցության տակ ստացվել է ռեբրսիա դեպի վալրի տիպ:

Ավելի քան 200 անգամ մոտացիաների հանդիպման հաճախականության ավելացում նկատվել է մոտագենիզացված ֆագի պրեպարատը ռեստրիկտիվ շտամի գազոնի վրա անմիջական ցանքի դեպքում:

Ստացված արդյունքները բացատրվում են նրանով, որ ըստ երևույթին, հնարավոր է մոտացիաներ ստանալ առանց ԴՆԹ-ի ռեգուլիկացիայի, և որ ակիլացնող ազենտները (համենայն դեպս դիէթիլ սուլֆատը) առաջացնում են մոտացիաներ ոչ միայն գուանինի հետ փոխազդելով, այլև ԴՆԹ-ի մոլեկուլում գտնվող ուրիշ հիմքերի, ամենից հավանականը՝ ադենինի հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. А. Бактериофаги, стр. 397, изд. Иностранной литературы, М., 1961.
2. Алиханян С. И., Мкртумян Н. М. Микробиология, XXXIV, стр. 101—109, 1965.
3. Алиханян С. И., Оганесян М. Г. Вестник Академии медицинских наук СССР, I, стр. 72—84, 1964.
4. Бреслер С. Е. Введение в молекулярную биологию, стр. 327, Изд. Наука, М., 1966.
5. Фриз Э. Тр. V МБК. Структура и функция на молекулярном уровне, стр. 231, Изд. Наука, М., 1962.
6. Фриз Э. Сб. статей. Молекулярная генетика, стр. 247—296, т. I, Изд. Мир, М., 1964.
7. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов, стр. 212—213, Изд. Мир, М., 1965.
8. Черник Т. П., Кривисский А. С. Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов, стр. 139—140, т. I, М., 1965.
9. Brenner S., Beckwith J. R. J. Mol. Biol. 13, 629—37, 1965.
10. Brenner S., Stretton A. and Kaplan S. Nature, 206, 994, 1965.
11. Brooks P., Lawley P. Biochemical J., 89, 138, 1963.
12. Crathorn A., Roberts J. Nature, 211, 46—48, 1966.
13. Drake S., McGuire I. Genetics, 55, 387—398, 1967.
14. Epstein R. H. et al. Cold Spring Harbor Symposium, Quant. Biology, 28, 375—394, 1963.
15. Freese E. Brookhaven Symposium in biolog., 12, 63, 1959.
16. Krieg D. R. Virology, 9, 215, 1959.
17. Löbbecke E. A., Krieg D. R. Genetics, 47, 968, 1962.
18. Muller H. J., Carlson E. A., Oster I. Genetics, 46, 213, 1961.
19. Nishimura S., Jones D., Ohtsuka E. a.o. J. Mol. Biology, 13, 283—302, 1965.
20. Ryan F. I. J. Gen. Microbiology, 21, 530, 1950.
21. Tessman E. S. Virology, 2, 679, 1956.
22. Warner H. R., Barnes I. E. Virology, 28, 100—107, 1966.