

С. Д. КОНОНОВА, Л. Л. ГУМАНОВ

МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ АЛКИЛФОСФАТОВ НА ФАГ Т4В И АЛКИЛИРОВАНИЕ ФАГОВОЙ ДНК

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 18 VIII 1970)

Несмотря на разнообразие известных сейчас химических мутагенов, поиски новых соединений, обладающих мощным мутагенным действием, целесообразны в основном по следующим причинам. Как известно, в практической селекции нашло применение ограниченное число химических мутагенов вследствие небольшого выхода полезных мутаций или вследствие специфического отсутствия мутагенного действия на некоторые виды организмов, или же из-за недоступности препаратов. Таким образом, новые мощные химические мутагены увеличивают возможности активной селекции и расширяют границы направленных изменений генетического аппарата организмов.

Мутагенное действие таких алкилирующих агентов, как эфиры серной и сульфоновой кислот, известно. Подробно изучено биологическое действие этих веществ на различных объектах — растениях, бактериях, актиномицетах и различных вирусах (¹⁻³). *In vivo* на фage T4, *in vitro* на ДНК, ее основаниях и дезоксирибонуклеотидах выяснен молекулярный механизм мутагенного действия главных представителей этой группы соединений (⁴⁻⁷).

Среди эфиров минеральных кислот хорошо изучена алкилирующая способность эфиров ортофосфорной кислоты, для которых была показана возможность алкилирования самых разнообразных соединений (⁸). Поэтому нами было исследовано мутагенное действие триметилфосфата и триэтилфосфата на фag T4В и сделана попытка обнаружить алкилирование триметилфосфатом фagовой ДНК.

Мутагенное действие триметилфосфата и триэтилфосфата исследовалось на бактериофage T4В *Escherichia coli* по частоте появления г-мутаций. Использовалась питательная среда следующего состава: бактопептон 10 г, натрий хлористый 8 г, натрий лимоннокислый трехзамещенный 2 г, глюкоза 1 г, триптофан 10 мг, вода дистиллированная 1 л. Методики выращивания и посева *E. coli* и фaga — по Адамсу (⁹). Триметилфосфат и триэтилфосфат представляли собой товарные препараты. Перед употреблением алкилфосфаты очищали перегонкой. Внеклеточный бактериофag в титре 10^{10} корпускул в 1 мл обрабатывали 0,084 М раствором алкилфосфатов в 0,2 М карбонатном буфере при 27° на качалке. Время обработки суспензии фaga подбирали эмпирически. Концентрирование и очистку фaga для эксперимента *in vitro* производили на ДЭАЭ-целлюлозе. Хроматографию на бумаге вели в системах: 1) бутанол — муравьиная кислота — вода (77 : 10 : 13) и 2) 86% водный раствор бутанола (1 : 1) с 5 об. % концентрированного раствора NH_3 (уд. вес 0,88). 7-Метилгуанин, использующийся как свидетель, был любезно предоставлен А. М. Серебряным. Спектры поглощения в у.-ф. области снимали на спектрофотометре СФ-4.

В табл. 1 представлены данные о мутагенном действии триметил- и триэтилфосфата на фag T4В по частоте появления г-мутаций. Как видно, максимум мутаций для триметилфосфата наблюдался при экспозиции 24 часа. При выживании в 0,5% частота появления г-мутаций возрастала в 47 раз по сравнению с контролем. При экспозиции 48 час. для триметил-

фосфата наблюдается снижение частоты появления мутаций до уровня 0,4 на 1000, которое характерно для больших доз радиации и химических мутагенов. Для триэтилфосфата наблюдалось сильное инактивирующее действие на фag. Так, при экспозиции 24 часа выживание составляло всего $2 \cdot 10^{-4}\%$, а при экспозиции 48 час. инактивировалось 100%. Слабое мутагенное действие триэтилфосфата можно объяснить тем, что алкилирующая способность его по сравнению с триметилфосфатом слабее в 600 раз⁽⁵⁾, но инактивирующая способность выше, чем у триметилфосфата.

Для доказательства того, что при действии триметилфосфата на фag происходит действительно алкилирование его ДНК, были поставлены

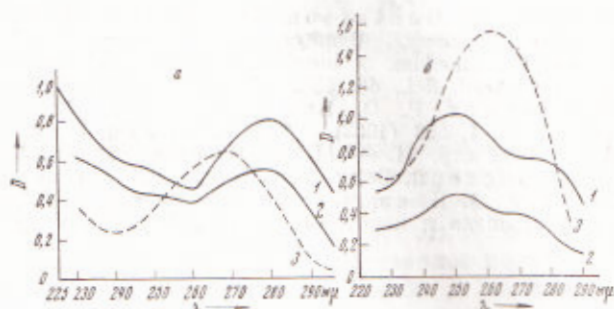


Рис. 1. У-ф. спектры поглощения продуктов взаимодействия триметилфосфата с ДНК фага в 0,1 N KOH (а) и 0,1 N HCl (б). 1 — 7-метилгуанин, 2 — вещество I, 3 — вещество II

эксперименты по обнаружению N-7-метилгуанина. Если, действительно, триметилфосфат способен алкилировать ДНК фага, то наряду с прочими продуктами алкилирования должен образоваться 7-метилгуанин⁽⁷⁾. Алкилирование гуанина в 7-м положении, как это было показано для метилсульфоната и других алкилирующих соединений⁽⁵⁾, приводит к ослаблению связи N-9 с дезоксирибозой, и возможно отщепление 7-метилгуанина от дезоксирибозофосфатного остова молекулы ДНК. Таким образом, если диализовать суспензию фага, обработанную предварительно алкилирующим агентом, в диализате должен быть обнаружен 7-метилгуанин.

Для этого эксперимента использовали суспензию фага, предварительно сконцентрированную до 10^{13} корпускул в 1 мл. Обработку производили 3% раствором триметилфосфата при 37° в течение 6 суток, затем обработанный бактериофаг диализовали против дистиллированной воды. Диализат упаривали до 2 мл и хроматографировали на бумаге со свидетелем — 7-метилгуанином. На хроматограмме было обнаружено два вещества. R_f одного из них в обеих системах растворителей соответствовало R_f 7-метилгуанина (0,14 в 1-й системе и 0,08 — во 2-й). Второе соединение имело R_f 0,35 и 0,18 соответственно в системах 1-й и 2-й. После элюирования веществ с бумаж-

Таблица 1

Мутагенное действие триметилфосфата и триэтилфосфата на фag T4B⁽⁸⁾
(среднее для 4 экспериментов)

Мутаген	Обработка 24 часа		Обработка 48 час.	
	выживание, %	частота мутаций (на 1000)	выживание, %	частота мутаций (на 1000)
Триметилфосфат	$0,5 \pm 0,16$	$4,7 \pm 0,5$	$2 \cdot 10^{-2} \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$	$0,4 \pm 0,14$
Триэтилфосфат	$2 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$	$0,2 \pm 0,04$	0	0
« (контроль)	100	$0,1 \pm 0,01$	100	$0,1 \pm 0,01$

ной хроматограммы были сняты у.-ф. спектры поглощения их в кислой и щелочной средах (рис. 1). Для вещества I спектр поглощения в обеих средах идентичен со спектром свидетеля — 7-метилгуанина. Для вещества II спектр поглощения в кислой и щелочной среде идентичен описанному спектру 1-метиладенина (¹⁰, ¹¹).

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
7 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. A. Ehrenberg, A. Gustafson, U. Lundquist, *Hereditas*, 47, 243 (1961). ² A. Ronen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12, 439 (1963). ³ H. Frankel-Conrat, *Biochim. et biophys. acta*, 49, 169 (1961). ⁴ E. Bautz, E. Freese, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46, 1585 (1960). ⁵ D. R. Krieg, *Genetics*, 48, 561 (1963). ⁶ P. Brookes, P. D. Lawley, *Biochem. J.*, 80, 496 (1961). ⁷ B. C. Pal, *Biochemistry*, 1, 558 (1962). ⁸ Д. М. Браун, В кн. *Успехи органической химии*, 3, М., 1966, стр. 71. ⁹ М. А. Адамс, *Бактериофаги*, ИЛ, 1961, стр. 390. ¹⁰ Т. В. Венкстерн, В кн. *Усп. биол. хим.*, «Наука», 1, 1964, стр. 22. ¹¹ Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, *Спектры поглощения минорных оснований, их нуклеотидов, нуклеозидов и некоторых олигорибонуклеотидов*, «Наука», 1965, стр. 15.