

В. В. АНДРОСОВ

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ МУТАЦИЙ У *ESCHERICHIA COLI* K12 ПОД ДЕЙСТВИЕМ N-НИТРОЗО-N-МЕТИЛМОЧЕВИНЫ

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 4 I 1973)

Мутагенный эффект супермутагена N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) на бактериальных объектах изучен недостаточно полно. Известно, что НММ на штаммах *E. coli* K12, индуцирует общее количество ауксотрофных мутантов с частотой, в несколько сот раз превышающей соответствующие индексы мутагенеза для у.-ф. лучей и аналогов оснований (¹).

Целью данного исследования было изучение специфичности мутагенного действия НММ на штаммы *E. coli* K12 — HfrC (met, str^s(λ)) и J62 (pro, his, trp, lac, str^s(λ)), а также изучение количественного образования различных классов мутантов.

Обработку культур (10⁹ кл/мл) проводили в фосфатно-цитратном буфере (рН 6,0) при концентрации НММ 4,5·10⁻² М. Через 60—75 мин. мутаген инаktivировали 0,01 N NaOH в бульоне и культуры рассеивали на 1,3% агар Хоттингера, из расчета 200—300 клеток на чашку. Было изолировано 184 ауксотрофных мутанта по цистеину из штамма HfrC и 198 — из штамма J62, идентифицированных ауксонографией (²).

Для изучения природы возникших мутационных изменений у полученных цистеиновых мутантов исследовали их реверсию к дикому фенотипу под действием различных мутагенных агентов: нитрозогуанидина (НГ), диэтилсульфата (ДЭС), 5-бром урацила (5-БУ), 2-аминопурина (2-АП), гидроксилamina (ГА), азотистой кислоты (HNO₂), акридиноранжа (АО), у.-ф. лучей и НММ. Наряду с этим исследовалась реверсия мутантов к дикому фенотипу спонтанно, а также при трансдукции фагом P1.

Для получения ревертантов под действием 5-БУ, 2-АП, ГА, ДЭС, НГ и НММ применялся экспресс-тест «репликативная реверсия». Для этих целей мутанты, выращенные на полноценной среде, отпечатывались на агаре М-9 без цистеина, но с добавлением факторов роста для каждого штамма. На отпечаток накладывался круг фильтровальной бумаги («Filtrak»), пропитанный раствором мутагена. Чашки с отпечатками инкубировались при 37° в течение 18 час. и 24 часа при комнатной температуре. После удаления бумаги учитывали количество культур, давших рост. В некоторых случаях для сравнения мутаген добавляли непосредственно в среду М-9 по методу (³). В этих экспериментах более четкие результаты были получены добавлением в среду М-9 1/80 части питательного бульона: ревертанты в отличие от мутантов давали более пышный рост.

Обработка цистеиновых мутантов АО осуществлялась в логарифмической стадии роста клеток, а обработка культур у.-ф. лучами в 0,9% NaCl, после чего клетки высевали на селективный агар М-9. Трансдукция фагом P1 прототрофности по цистеину осуществлялась по стандартной методике (⁴). Результаты исследований представлены в табл. 1. Анализ ревертантов показал, что основное количество цистеиновых мутантов, полученных под воздействием НММ (84—89%), возникло в результате транзиций и трансверсий в обоих направлениях. Из них 44—47% мутантов ревертировалось к дикому фенотипу под действием аналогов оснований, ГА, HNO₂ и у.-ф. лучей. Остальные 39—41% мутантов ревертировали под действием

ДЭС, НГ, НММ, спонтанно и около 10% из них ревертировало под действием у.-ф. лучей. Вся эта группа мутантов восстанавливала дикий фенотип при трансдукции фагом Р1. Около 2% мутантов ревертировало только под действием АО, а также при трансдукции фагом Р1. Эти результаты свидетельствуют о способности НММ с низкой частотой индуцировать мутации с сдвигом рамки. Остальные 9,8% мутантов штамма HfrC и 13,2% мутантов штамма J62 можно было разделить на две группы по способности ревертировать при трансдукции фагом Р1. Первую группу составляли мутан-

Таблица 1

Реверсия цистеиновых мутантов под действием мутагенов, спонтанно и трансдукции фагом Р1

| Мутаген- ные агенты | HfrC *, % | J62 *, % | Мутагенные агенты | HfrC *, % | J62 *, % |
|---------------------------|-----------|----------|----------------------|-----------|----------|
| НММ | 89,1 | 84,8 | HNO ₂ | 27,7 | 32,4 |
| НГ | 89,1 | 84,8 | УФ | 29,0 | 34,5 |
| ДЭС | 89,1 | 84,8 | АО | 1,1 | 2,0 |
| 5-БУ | 45,1 | 40,3 | Спонтанно | 65,8 | 70 |
| 2-АП | 47,3 | 43,8 | Трансдукция Р1 | 97,7 | 96,0 |
| ГА | 21,7 | 25,8 | | | |

* HfrC — 184 мутанта, J62 — 198 мутантов.

ты, не способные ревертировать под действием всех изученных мутагенов. Их реверсия наблюдалась лишь при трансдукции фагом Р1. При длительном пассировании мутантов первой группы на полноценных питательных средах часть их восстановила способность ревертировать спонтанно, а также под действием НММ и аналогов оснований. По-видимому, у этих мутантов НММ индуцировала несколько точковых мутаций в пределах цистрона. Аналогичный эффект наблюдался у некоторых мутантов, полученных под действием ДЭС⁽⁵⁾ и НГ⁽⁶⁾. Вторая группа мутантов вообще потеряла способность к реверсии под действием мутагенов, а также при трансдукции фагом Р1. Восстановление дикого фенотипа у мутантов этой группы, исследованных у штамма J62, наблюдалось лишь при образовании рекомбинантов в конъюгации с бактериальными донорами АВ312 (O—pro—trp—his) и АВ313 (O—his—trp—pro).

Что касается мутационной природы повреждений, вызванной НММ у мутантов второй группы, то их возникновение можно определить двумя или более мутациями, повреждающими различные цистроны биосинтеза цистеина. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, показавшие способность мутантов этой группы ревертировать к дикому фенотипу при длительном пассировании на полноценных питательных средах.

Таким образом, НММ способна индуцировать на штаммах *E. coli* K12 мутации типа транзиций (АТ \rightleftharpoons ГЦ) и трансверсий (АТ \rightleftharpoons ЦГ), а также с низкой частотой мутации с сдвигом рамки. Особенностью мутагенного эффекта НММ является способность индуцировать множественные точковые мутации внутри одного цистрона, а также точковые мутации, затрагивающие различные цистроны биосинтеза цистеина одновременно.

Второй Московский государственный
медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Поступило
28 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. З. Миндлин, Л. Г. Чуркина, Генетика, № 4, 96 (1968). ² R. Holliday, Nature, v. 178, 987 (1956). ³ A. Eisenstark, J. L. Rosner, Genetics, v. 49, 343 (1964). ⁴ F. Jacob, Virology, v. 1, 207 (1955). ⁵ Y. Nishioka, Microbiol. Gen. Bull., v. 19, 29 (1963). ⁶ A. Eisenstark, R. Eisenstark, R. V. Sickle, Mut. Res., v. 2, 12 (1965).