

Академик Н. П. ДУБИНИН, В. Д. ФИЛИПШОВ, Е. Е. ЗАГОРУЙКО

НЕЗАВИСИМОСТЬ У.-Ф.-ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА ОТ ПОСТРАДИАЦИОННОЙ РЕПЛИКАЦИИ ДНК У *BACILLUS SUBTILIS*

Согласно гипотезе (¹⁻³), мутации в у.-ф.-облученных бактериях производятся индуцируемой системой пострепликативной репарации; конститутивная эксцизионная репарация является антимутагенной. Если у.-ф.-индуцированный мутагенез действительно сопряжен с пострадиационной репликацией ДНК, то искусственное задерживание начала репликации в условиях, благоприятных для синтеза белка, должно вызывать снижение частоты мутаций в результате проявления антимутагенной активности эксцизионной репарации. Это предположение проверено нами в опытах с мутантами *B. subtilis*, температурочувствительными по синтезу ДНК.

Изогенные штаммы 1201-05 *ade6 met5 ts dnaC* (ауксотроф по аденину и метионину) и 1001-05 *ts dnaC* (прототроф) получены (⁴) путем переноса мутации *ts dnaC* с помощью трансформации из *B. subtilis* 230 (⁵) в 1201 *ade6 met5* и 1001 (⁶). В у.-ф.-облученных клетках, имеющих мутацию *ts dnaC*, вегетативная репликация ДНК не возобновляется в течение всего времени выдерживания их в ростовой среде при непермиссивной температуре (42°); синтез белка при этом не нарушается (⁴).

Бактерии выращивали в глюкозо-солевой среде (⁷) с гидролизатом казеина (1 г/л), дрожжевым экстрактом (1 г/л) и добавками, удовлетворяющими ауксотрофность (по 50 мг/л), на круговой качалке при 34°. В середине экспоненциальной фазы роста клетки собирали на мембранные фильтры, промывали теплой безазотистой средой (глюкозо-солевой средой, не содержащей источников азота), ресуспендировали в двойном объеме такой же среды и после 30 мин. инкубации при 34° облучали под лампой БУФ-15 при непрерывном перемешивании. Репликацию ДНК в облученных бактериях стимулировали, помещая их на необходимое время в ростовую среду при 34°. Начало репликации определяли по Смитсу и О'Лири (⁸), измеряя количество ДНК в аликвотах культуры химическим способом (⁹). Мутанты *Met*⁺ (ревертанты к метиониннезависимости) и выживаемость определяли на агаризованной (1,5% агара) глюкозо-солевой среде с аденином (50 мг/л), обогащенной гидролизатом казеина (40 мг/л). Трансформационные эксперименты выполняли так же, как в работе (⁶).

На рис. 1 приведены результаты определения частоты индуцированных мутаций *Met*⁺ в клетках 1201-05, начавших репликацию ДНК в раз-

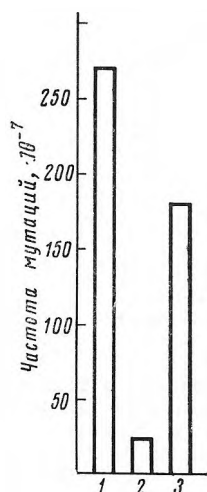


Рис. 1. Частота индуцированных мутаций *Met*⁺ в клетках *B. subtilis* 1201-05, начавших репликацию ДНК через 45 мин. (1) и 140 мин. (2, 3) после облучения у.-ф. светом (40 сек., 30% выживаемости). Начало пострадиационной репликации задерживалось инкубацией при 42° в безазотистой среде (2) или ростовой среде (3)

ное время после облучения. В контрольной порции клеток репликация возобновлялась через 45 мин. (пострадиационная инкубация в ростовой среде при 34°), а в двух других порциях — через 140 мин. (пострадиационная инкубация 100 мин. в безазотистой среде при 42°+40 мин. в ростовой среде при 34° или 110 мин. в ростовой среде при 42°+30 мин. при 34°). Можно видеть, что при одинаковой задержке первого раунда пострадиационной репликации частота мутаций снижается в 10 раз в клетках, проинкубированных в безазотистой среде, и в 1,7 раза в клетках, проинкубированных в ростовой среде (по сравнению с контролем). Таким образом,

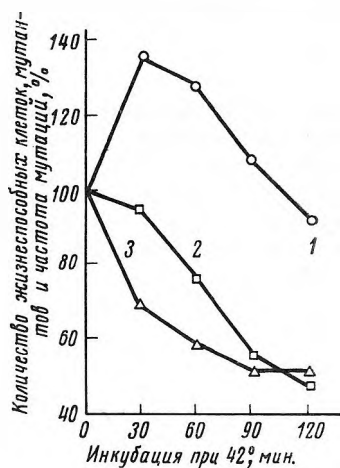


Рис. 2. Влияние прогревания при 42° у.ф. облученных клеток *B. subtilis* 1201 на выживаемость (1), выход индуцированных мутантов Met⁺ (2) и частоту мутаций (3). Инкубация при 42°, с последующим переносом в температуру 34°. Количество выживших клеток и мутантов и частота мутаций в суспензии, не инкубированной при 42°, приняты за 100%

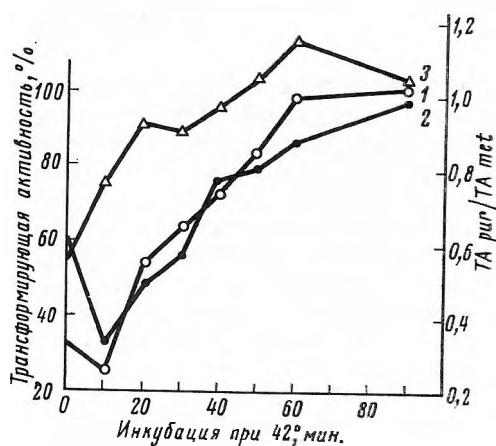


Рис. 3. Восстановление сниженной у.ф.-облучением трансформирующей активности (ТА) маркеров purB (1) и metB (2) клеточной ДНК по мере пострадиационной инкубации *B. subtilis* 1001-05 в ростовой среде при 42°. ДНК экстрагировали из клеток перед облучением, сразу после облучения (20% выживших клеток) и по мере последующей инкубации и использовали для трансформации ауксотрофного мутанта adeB met5 urg⁺ (6). ТА маркеров ДНК, выделенной из необлученных клеток, приняты за 100%, а соотношение между ними (3) — за единицу

временная задержка репликации в условиях, благоприятных для синтеза белка, не приводит к такому снижению частоты мутаций, как равная по продолжительности задержка репликации при азотистом голодании.

Снижение, наблюдаемое в ростовой среде, по-видимому, вообще не связано с ингибированием репликации непермиссивной температурой. Об этом свидетельствует тот факт, что в облученных клетках 1201, не имеющих мутации *ts dnaC*, частота мутаций Met⁺ снижается в 2 раза после прогревания при 42° в жидкой ростовой или на плотной селективной среде (на рис. 2 приведены результаты опытов с инкубацией на плотной среде, в которых исключалась возможность артефактов, связанных с сегрегацией бактерий). Очевидно, при повышенной температуре происходит «термореактивация» мутаций. Временное блокирование репликации непермиссивной температурой в клетках 1201-05, инкубируемых в ростовой среде, не вносит дополнительного вклада в снижение частоты мутаций, обусловленное «термореактивацией». Этот факт можно объяснить в рамках гипотезы (1-3), если предположить, что мутация *ts dnaC* нарушает нормальное функционирование эксцизионной репарации в облученных бактериях, инкубируемых в ростовой среде при непермиссивной температуре. Это предположение опровергается экспериментальными данными. На рис. 3

представлены результаты определения скорости восстановления биологической (трансформирующей) активности маркеров клеточной ДНК в облученных клетках 1001-05, инкубируемых в ростовой среде при 42°. Видно, что трансформирующие активности маркеров *purV* и *metV*, сниженные в результате облучения клеток 1001-05, увеличиваются до исходного уровня за 90 мин. инкубации в указанных условиях. Ранее установлено ⁽⁶⁾, что в отсутствие репликации ДНК восстановление биологической активности клеточной ДНК у *B. subtilis* осуществляется только системой эксцизионной репарации. Следовательно, полученный результат свидетельствует о высокой эффективности репарации у.-ф.-повреждений в клетках мутанта *ts dnaC* при 42°. Если, как принято считать, предмутационные повреждения удаляются из ДНК системой эксцизионной репарации, то на основании всего вышеизложенного можно заключить, что процесс образования у.-ф.-индуцированных мутаций у *B. subtilis* не сопряжен с пострадиационной репликацией ДНК.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 III 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ *M. Defais, P. Fauquet et al.*, *Virology*, v. 43, 495 (1971). ² *E. M. Witkin*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 71, 1930 (1974). ³ *S. G. Sedgwick*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 72, 2753 (1975). ⁴ *Э. К. Лекевичюс*, Канд. дисс., М., 1974. ⁵ *G. W. Bazill, Y. Reijief*, *J. Gen. Microbiol.*, v. 56, 87 (1969). ⁶ *В. Д. Филунов*, Генетика, т. 12, № 3, 126 (1976). ⁷ *J. Spizizen*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 44, 1072 (1958). ⁸ *K. C. Smith, M. E. O'Leary*, *Biochim. et biophys. acta*, v. 169, 430 (1968). ⁹ *C. O. Doudney*, *Mutat. Res.*, v. 12, 121 (1974).