

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРОЗОГУАНИДИНА В КАЧЕСТВЕ ИНДУКТОРА МУТАЦИЙ, УСИЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРОМОТОР

Смирнов О. Ю.

СумГУ, кафедра физиологии и патофизиологии с курсом медицинской биологии

Промоторы бактериальных генов имеют разнообразную структуру, но для изучения принципов формирования комплекса РНК-полимераза–промотор недостаточно исследовать природные промоторы. Эффективным средством может быть изучение индуцированных мутаций, повышающих или понижающих экспрессию генов. Силу промотора удобно оценивать по устойчивости бактериального штамма к антибиотику, если между уровнем такой устойчивости и уровнем экспрессии соответствующего гена имеется прямая зависимость (хотя бы в определённом интервале). Примером такого гена-мишени может быть ген устойчивости к тетрациклину.

N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (короткое название – нитрозогуанидин) – алкилирующий канцероген достаточно простой структуры: $\text{CH}_3\text{-N}(\text{NO})\text{-C}(\text{NH})\text{-NH-NO}_2$, с мол. массой 147,09. Он вызывает метилирование аденина и гуанина в ДНК и последующую апуринизацию. Нитрозогуанидин широко используется в экспериментах для получения индуцированных мутаций.

Нами были подобраны условия экспериментального получения промоторных мутаций в гене устойчивости к тетрациклину. Мутагенная обработка культур *Escherichiacoli*, несущих плазмиды, производные от pBR322 и содержащие ген устойчивости к тетрациклину (неизменённый или видоизменённый), проводилась следующим образом. К бульону Хоттингера приливали 1/50 объёма ночной культуры *E. coli*, подращивали до оптической плотности 0,6, разливали по 2,5 мл в несколько пробирок. В опытные пробирки добавляли раствор нитрозогуанидина в цитратном буфере (0,1 М цитрат натрия, pH 5,5) до конечной концентрации 10–20 мкг/мл. Подращивали на качалке 2 часа при 37°, высевали по 0,05–0,1 мл на агар с тетрациклином. Контролем служила культура, не обработанная мутагеном. Было обнаружено, что концентрации нитрозогуанидина 10 и 15 мкг/мл действуют приблизительно одинаково и существенно не снижают жизнеспособность бактерий в сравнении с контролем, а концентрация 20 мкг/мл уменьшает число жизнеспособных клеток примерно в 20 раз, причём число клеток, устойчивых к тетрациклину, также снижается более чем в 5 раз. Таким образом, оптимальной концентрацией мутагена является концентрация 10 мкг/мл нитрозогуанидина.

Частота образования спонтанных мутаций устойчивости к тетрациклину в штамме С600, несущем плазмиду, составляла около 10^{-8} . Частота мутаций, индуцированных нитрозогуанидином, составила 10^{-4} (дополнительные исследования нескольких полученных мутаций показали, что они произошли в плазидах), причём в другом контроле, при обработке мутагеном штамма С600, не несущего плазмиды, частота образования Tet^r-колоний (т.е. хромосомных мутаций) была около 10^{-6} .