

4. Hamelin C., Sarhan F., Chung Y.S. Ozone-induced DNA degradation in different DNA polimerase I mutants of E.coli K12 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1977. - V.77. N 1. - P. 220-224.
5. Конев С.В., Матус В.К., Мельникова А.М., Руденок А.Н. Действие озона на мембранозависимые функции дрожжевых клеток *Candida utilis* // *Микробиология.* - 1982. - Т. 51. № 2. - С. 220-223.
6. Hamelin C., Chung Y.S. Role of the pol, rec and dna gene products in the repair of lesions produced in E.coli DNA by ozone // *Studia Biophys.* - 1978. - V.68. N 3. - P. 229-235.
7. Poliquin L., Hamelin C., Chung Y.S. Isolment of characterisation du mutants sensibles ou resistans a l'ozone cher *Escherichia coli* B // *Can. J. Genet. Cytol.* - 1982. - V.24. N 5. - P. 593-600.
8. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Т. Курс химической кинетики. М.: Высшая школа, 1984.

УДК 537.37

Н.В.Гриц, доцент;  
В.К.Ющенко, зав. лаб.;  
А.Ю.Фомичев, научн.сотр.

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ E.COLI K-12 ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ, ОБРАБОТАННОЙ ОЗОНОМ

Influence ozonation of bacteria E.coli on efficiency of genetic transformation, influence ozonation of isolated DNA on frequency transformation.

Как было показано в предыдущей статье [1], озонирование бактерий приводит к повреждениям ригидной клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. На этом основании правомочно предположение, что при определенных дозах воздействия озон может повышать состояние компетентности клеток, выражающееся в увеличении частоты генетической трансформации бактерий изолированной дезоксирибонуклеиновой кислотой.

Действительно, обработка бактерий E.coli K-12 AB1157 озонем в высоких дозах (40 с и 60 с воздействия при концентрации O<sub>3</sub> 0,4 мг/л воздуха и скорости продувки 0,1 л/мин) увеличивала эффективность формирования трансформантов к прототрофности по пролину, гистидину, лейцину и аргинину (рис.1). При обработке в более высоких дозах эффективность трансформации снижалась, вероятно, за счет инактивации бактерий вследствие глубоких и необратимых повреждений клеточной стенки.

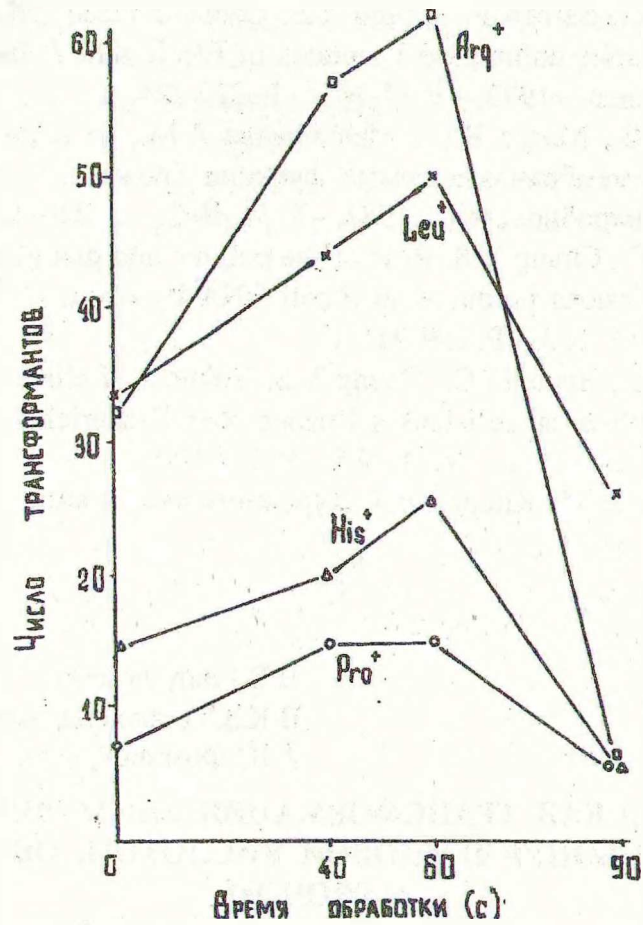


Рис. 1. Влияние обработки бактерий *E. coli* K-12 AB1157 озоном на выход трансформантов

Расчеты показали, что частота трансформации максимальна при воздействии озоном в дозах, снижающих выживаемость бактерий примерно в 2 раза (рис.2).

Таким образом, на основании представленных данных можно заключить, что озон может быть использован в качестве одного из доступных и эффективных агентов для повышения у бактерий состояния компетентности в отношении поглощения внеклеточной трансформирующей ДНК.

С целью установления влияния озона на трансформирующую активность обработанной *in vitro* ДНК использовали интактные клетки штамма AB1157. Было установлено, что по мере увеличения дозы воздействия  $O_3$  число трансформантов по всем 4-м исследованным генам уменьшалось (рис.3).

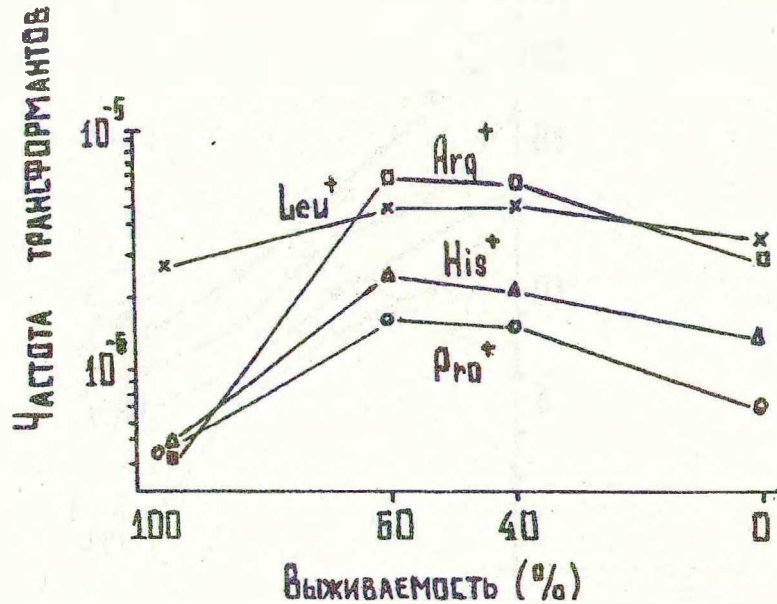


Рис. 2. Зависимость частоты трансформантов от степени инактивации бактерий озоном

В числе основных причин снижения трансформирующей активности ДНК могут быть: фрагментация ДНК (адсорбироваться и поглощаться компетентными клетками может лишь ДНК размером не менее 0,3 МД) [2, 3]; деспирализация ДНК за счет разрыва водородных связей и снижения стэкинг-взаимодействий между основаниями, стабилизирующих спиральную структуру; деструкция азотистых оснований в результате озонлиза.

Одним из подходов, позволяющих регистрировать повреждаемость нуклеиновых кислот, является измерение оптической плотности контрольного и обработанных озоном образцов ДНК. Нами установлено, что озонирование ДНК в дозах, существенно снижающих ее трансформирующую активность (время воздействия от 15 с до 3 мин при концентрации  $O_3$  0,4 мг/л воздуха), сопровождается уменьшением степени регулярности или спиральности ДНК, регистрируемой по величине гиперхромного эффекта (рис.4), т.е. имеет место деспирализация (плавление) ДНК.

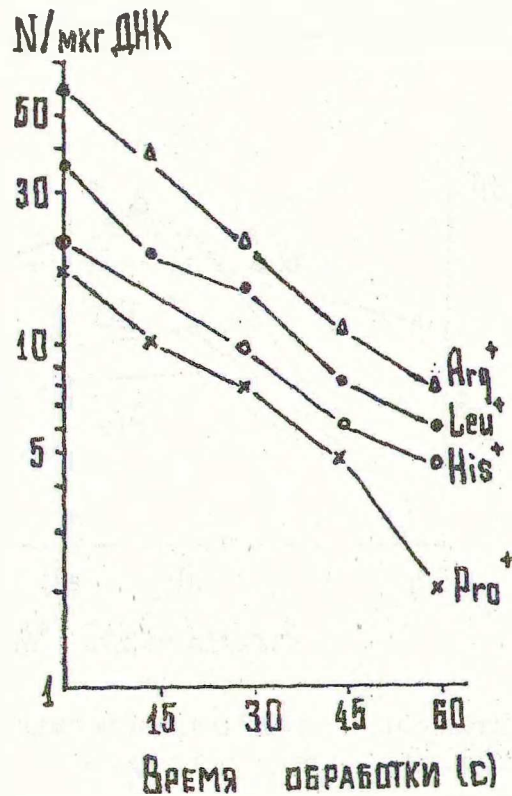


Рис. 3. Влияние озонирования раствора ДНК на ее трансформирующую активность

Известно, что величина гиперхромного эффекта (температуры плавления ДНК) при тепловой денатурации ДНК является функцией ионной силы раствора и указывает на вклад ионных взаимодействий в стабильность спирали [4]. В нашем случае при воздействии на раствор ДНК озном гиперхромный эффект также изменялся по мере увеличения концентрации ионов в буфере SSC (рис.5).

Наблюдаемое снижение оптической плотности образцов ДНК, обработанных в течение 3-х и более мин (рис. 4, 5), является следствием деструкции циклических хромофорных групп - азотистых оснований. Нельзя исключить, что деструкция оснований имеет место и на начальных стадиях озонирования, и это приводит к снижению величины гиперхромного эффекта в результате наложения двух событий. Если это так, то регистрируемый гиперхромный эффект не отражает реально степень плавления ДНК в результате озонирования, так как величина оптической плотности, отражающая процесс плавления, уменьшается на величину потерь оптической плотности за счет деструкции отдельных оснований.

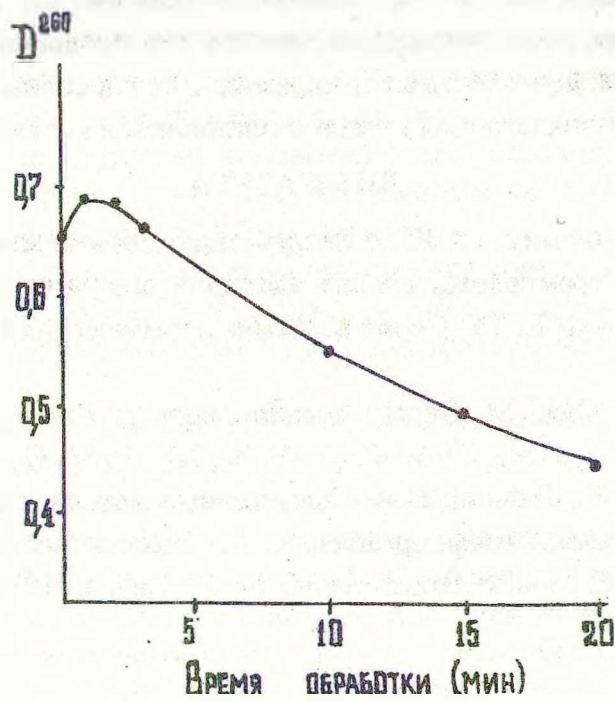


Рис. 4. Изменение оптической плотности раствора ДНК при озонировании

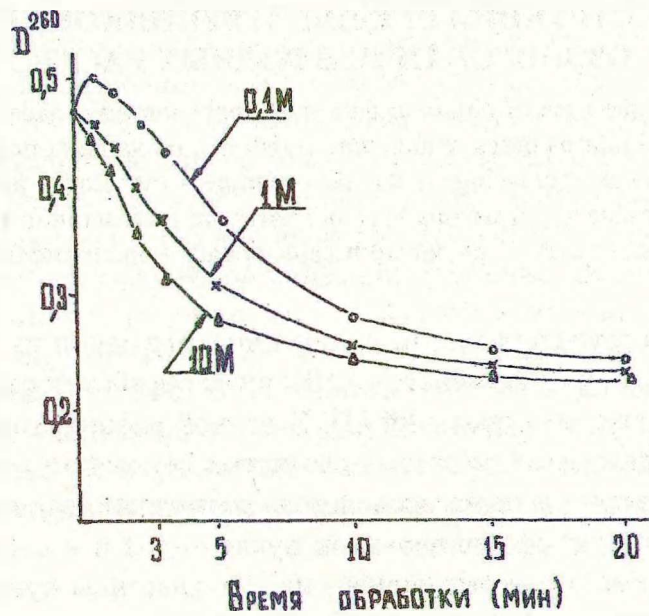


Рис. 5. Изменение оптической плотности раствора ДНК при озонировании в буфере SSC разной молярности

Нельзя исключить также, что наряду с описанными событиями вклад в снижение трансформирующей активности озонированной ДНК вносит и ее фрагментация до молекул малого размера, не способных адсорбироваться на поверхности клеточной стенки и поглощаться клеткой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. // Воздействие озона на клетки грамотрицательных и грамположительных бактерий при разных условиях обработки // Труды БГТУ. Серия 3. Химия и химическая технология. -1998. -Вып. 6.
2. Coslow S., Oishi M. Genetic transformation in Escherichia coli K-12 // Proc. Nat. Acad. Sci, USA. -1973. -V. 70. N1. -P. 84-87.
3. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. М.: Высшая школа, -1988.
4. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. Л.: Наука, -1973.

УДК 537.37

Н.В. Гриц, доцент;  
А.Ю. Фомичев, научн. сотр.;  
В.Н. Леонтьев, доцент

#### ДЕСТРУКЦИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ДНК ПРИ ОЗОНИРОВАНИИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

On the base of obtained data the conclusion was made, that ozone resistans of nitrous bases, which was registrated on value optical dencity there solutions are increacing in the set: guanine - cytosine - uracil - adenine. Ozone-resistence of nitrous base derivates are increasing in the set: nucleosidmonophosphate - nucleosidthreephosphate - nucleotides - polynucleotides.

В предыдущей работе было показано, что одной из причин снижения трансформирующей активности ДНК после обработки озоном является деструкция азотистых оснований [1]. В данной работе стояла цель сравнить степень повреждаемости разных азотистых оснований при обработке  $O_3$  в водных растворах, а также исследовать деструкцию оснований при их гликозидировании, фосфорилировании нуклеозидов и в составе полинуклеотидов по схеме азотистые основания - нуклеозиды-нуклеотиды (нуклеозидмонофосфаты и нуклеозидтрифосфаты) - полинуклеотиды. Следует отметить, что подобные исследования уже проводились в других лабораториях, но полученные результаты противоречивы и требуют уточнения [2,3].