ГЕНЕТИКА, 2020, том 56, № 6, с. 648–656

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 574.224.46

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ lux-БИОСЕНСОРЫ *Escherichia coli*, СОДЕРЖАЩИЕ ПЛАЗМИДЫ pRecA::lux, pColD::lux И pDinI::lux, ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОТОКСИЧНЫХ АГЕНТОВ

© 2020 г. С. К. Абилев[1], В. Ю. Котова[2], С. В. Смирнова[1, *], Т. Н. Шапиро[1], Г. Б. Завильгельский[2]

[1]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

[2]*Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (ГосНИИгенетика), Москва, 117545 Россия*

**e-mail: s.v.smirnova.genet@gmail.com*

Поступила в редакцию 14.11.2019 г.
После доработки 09.12.2019 г.
Принята к публикации 13.12.2019 г.

Сконструирован lux-биосенсор *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) и проведено сравнительное изучение SOS-ответа трех биосенсоров: *E. coli* MG1655 (pRecA::lux), *E. coli* MG1655 (pColD::lux) и *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) при воздействии генотоксичных агентов. Перечисленные биосенсоры обозначены соответственно: PRecA, PColD и PDinI. В качестве показателя уровня SOS-ответа lux-биосенсоров учитывали амплитуду ответа (АО). Показано, что АО биосенсора PDinI более выражена (чем АО биосенсора PRecA) при действии перекиси водорода, алкилирующих агентов НММ, ММС и стрептозотоцина, а также антибактериального средства диоксидина и цитостатиков митомицина С и *цис*-платины. Антиметаболит 5-фторурацил показал активность только на PDinI. Фурацилин и 4-НХО, метаболиты которых образуют аддукты с ДНК, были более активны на PColD, чем на PRecA и PDinI. Ингибиторы ДНК-гиразы: налидиксовая кислота и ципрофлоксацин, были менее активны на PDinI, чем на PColD и PRecA. В целом из 13 тестированных веществ восемь более активно индуцировали SOS-ответ у биосенсора PDinI, чем у PColD и PRecA. При этом 5-фторурацил индуцировал SOS-ответ только у биосенсора PDinI. Сделано заключение, что биосенсор PDinI может быть с успехом использован для первичного выявления потенциальных генотоксикантов по их способности индуцировать SOS-ответ в клетках *E. coli*.

Ключевые слова: lux-биосенсоры, *E. coli*, SOS-ответ, амплитуда ответа, промоторы SOS-генов, ген *dinI*, генотоксиканты, алкилирующие агенты, диоксидин, цитостатики.

DOI: 10.31857/S0016675820060028

В настоящее время lux-биосенсоры нашли применение как для экологического мониторинга, так и для изучения специфической биологической активности химических соединений. Такой биосенсор представляет собой бактериальную клетку, содержащую гибридную плазмиду, несущую два основных элемента: регуляторный участок (промотор и оператор) и гены-репортеры, кодирующие белки, образующие светящиеся комплексы. Lux-биосенсоры характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, что определяется особенностью взаимодействия белка-рецептора с тестируемым химическим веществом.

Для изучения генотоксичности химических и физических факторов широко применяют бактериальные lux-биосенсоры, содержащие гибридные плазмиды, в состав которых встроены регуляторные участки (промотор и оператор) генов *rec*A и *cda* (*col*D), а также *lux*-оперон люминесцирующей бактерии в качестве репортера [1–8]. В этом случае генотоксичность обнаруживается как результат активации SOS-системы у *E. coli*. При изучении с помощью lux-биосенсоров 47 химических соединений (главным образом фармакологических средств) 16 из них индуцировали SOS-ответ, а шесть – окислительный стресс [9]. Сравнение полученных результатов с ранее опубликованными данными о мутагенной активности изученных веществ в тесте Эймса показало полное совпадение результатов для 42 веществ. Это указывает на то, что lux-биосенсоры могут быть успешно использованы для выявления генотоксичных агентов при скрининге больших массивов химических соединений, а также для мониторинга образцов воды, аэрозолей воздуха и других компонентов окружающей среды. В этой связи становится актуальным изучение, помимо промоторов *precA* и *pcda*, характеристик других промоторов генов, входящих в SOS-систему *E. coli*, для использования их в lux-биосенсорах.

В настоящей работе проведено сравнительное изучение ответа биосенсоров *E. coli* MG1655 (pRecA::lux), *E. coli* MG1655 (pColD::lux) и *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) на генотоксичные химические соединения с различным механизмом ДНК-повреждающего действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование lux-биосенсора E. coli MG1655 (pDinI::lux)

Промоторно-регуляторная часть гена *dinI* была амплифицирована из генома *E. coli* MG1655 с помощью праймеров:

DIR 5'-GATGACACGCTGGTGCCATTCC-3'

REV 5'-GTTTTCGCTATGGTGACTTCAATTCG-3'.

Размер ампликона составил 740 пн. Полученный ПЦР-фрагмент встраивали в вектор pTZ57R. Трансформацию клеток штамма *E. coli* TG-1 проводили с помощью электропорации. Ориентацию встроенного фрагмента определяли, разрезая гибридную плазмиду по сайтам BamH1-EcoR1. Затем фрагмент ДНК, содержащий регуляторную область, вырезали из вектора pTZ57R и встраивали в беспромоторный вектор pDW201 [10]. В результате была сконструирована плазмидар DinI::lux размером 10 940 пн.

Для конструирования lux-биосенсора был выбран штамм *E. coli* MG1655. Данный штамм хорошо культивируется в стандартных средах при температурах 30 и 37°C. Биосенсорные штаммы на основе клеток *E. coli* MG1655 долго сохраняют свои свойства при лиофилизации. В результате трансформации был получен lux-биосенсор *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) (далее обозначен как PDinI).

Ответы биосенсоров на химические генотоксиканты

Химические соединения

Все химические соединения были аналитической чистоты. Митомицин С, *цис*-платина (*цис*-диаминодихлорплатина(II)), 4-НХО (4-нитрохинолин-1-оксид), N-нитрозо-N-метилмочевина, метилметансульфонат, стрептозотоцин, 2-аминопурин, 5-фторурацил и 5-бромурацил от “SigmaChemical Co” (США). Ципрофлоксацин от “Промед Экспортс Пвт. Лтд” (Индия), налидиксовая кислота от “Хиноин” (Венгрия). Лекарственные препараты из российских фармацевтических компаний: диоксидин (“Мосхимфармпрепараты”), фурацилин (“Татхимфармпрепараты”), перекись водорода (“Ferraine”). Все растворы тестируемых соединений готовили непосредственно перед их использованием.

Измерение интенсивности биолюминесценции

Культуры клеток lux-биосенсоров выращивали на полноценной среде Луриа-Бертани (LB) с добавлением ампициллина в конечной концентрации 100 мкг/мл в течение ночи при температуре 37°C. Ночную культуру разбавляли свежей средой в 100 раз. Измерения плотности суспензии (OD) проводили на денситометре DEN-1B (“Biosan”). Затем суспензию подращивали в течение двух часов при 37°C до логарифмической фазы.

Для определения активных концентраций генотоксикантов аликвоты культуры (по 180 мкл) переносились в стерильные ячейки планшета, в них же добавлялись индукторы в разных концентрациях в объеме 20 мкл, в качестве контроля использовали дистиллированную воду или соответствующий растворитель. Через 60 и 90 мин инкубации планшетов при 37°C проводили измерения интенсивности биолюминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400, AwarenessTechnologyInc (США).

В качестве главного параметра индукции люминесценции исследуемыми генотоксикантами определяли амплитуду ответа (**АО**) биосенсоров по следующей формуле: $R = (I_t - I_0)/(I_k - I_0)$, где I_0 – интенсивность люминесценции в момент добавления генотоксиканта (t = 0), I_k – интенсивность люминесценции в контроле (отсутствие генотоксиканта) в момент t, I_t – интенсивность люминесценции под действием генотоксиканта в момент t.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение основных параметров lux-биосенсора PDinI (E. coli MG1655 (pDinI::lux))

Для калибровки lux-биосенсора PDinI использовался митомицин С, который формирует в ДНК как аддукты, так и межнитевые сшивки, для репарации которых необходимы и система рекомбинационной пост-репликативной репарации и система эксцизионной репарации [11].

Интенсивность люминесценции клеток штамма *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) зависела от времени инкубации с различными концентрациями митомицина С (рис. 1).

Была определена амплитуда ответа lux-биосенсора *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) от времени инкубации с митомицином С для оптимальной и пороговой концентраций (табл. 1). Минимальное время ответа биосенсора *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) для концентрации митомицина С 10^{-6} М составило 20 мин, а пороговая концентрация митомицина С, при которой АО удваивается, – 10^{-9} М.

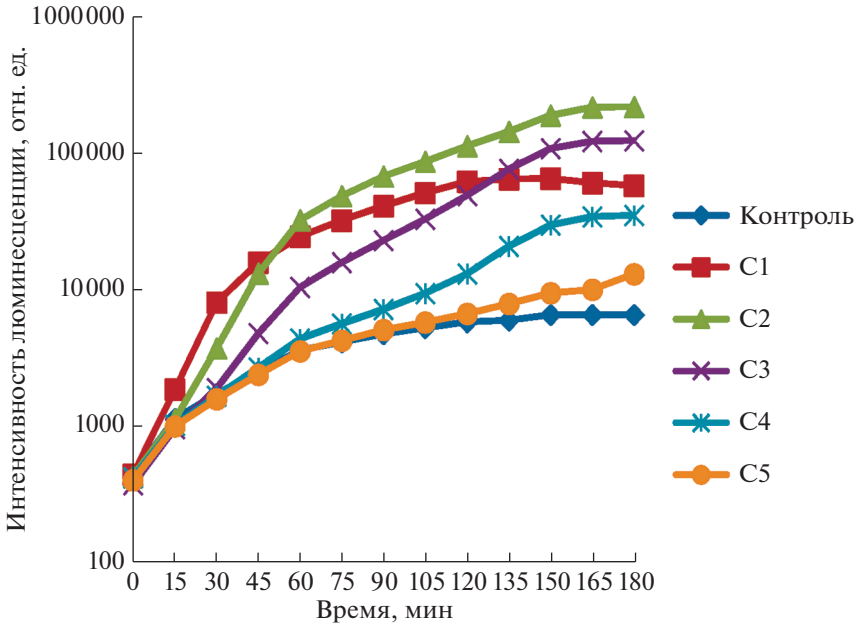

Рис. 1. Зависимость интенсивности люминесценции клеток штамма *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) от времени инкубации без митомицина С (контроль) и с митомицином С в концентрациях: С1 – 10^{-5}, С2 – 10^{-6}, С3 – 10^{-7}, С4 – 10^{-8}, С5 – 10^{-9} моль/л.

Ответ биосенсоров E. coli MG1655 (pRecA::lux) (PRecA), E. coli MG1655 (pColD::lux) (PColD) E. coli MG1655 (pDinI::lux) (PDinI) на действие генотоксичных химических соединений

В работе были использованы химические соединения, относящиеся к различным группам по своим биологическим активностям. В первую группу вошли применяемые в медицинской практике бактерицидные средства: диоксидин, фурацилин, ципрофлоксацин, налидиксовая кислота и перекись водорода, а также противоопухолевые цитостатики – митомицин С, *цис*-платина, стрептозотоцин и антиметаболит 5-фторурацил. Во вторую группу вошли известные мутагены, которые используются в работах по мутагенезу: 4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО), метилметансульфонат (ММС), N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ) и аналоги оснований 2-аминопурин и 5-бромурацил.

Тестирование перечисленных соединений на всех трех lux-биосенсорах проводили в восьми повторностях в трех независимых экспериментах. На рис. 2 приведены результаты изучения способности диоксидина индуцировать люминесценцию у биосенсоров PRecA, PColD и PDinI. Регистрировали зависимость интенсивности люминесценции биосенсоров в относительных единицах (RLU) от концентраций диоксидина в моль/л.

Из представленных графиков следует, что диоксидин у биосенсора PColD индуцирует люминесценцию в интервале концентраций 10^{-6}–10^{-4} моль/л, тогда как на биосенсорах PRecA и PDinI диапазон активных концентраций диоксидина составляет от 10^{-8} до 10^{-4} моль/л. Диоксидин в концентрациях более 10^{-4} подавляет свечение бактерий вследствие бактерицидного действия.

Пересчет данных по интенсивностям люминесценции биосенсоров в амплитуды ответа по тестированным концентрациям диоксидина при 60 и 90 мин экспозиции приведен на рис. 3 АО отражает отношение интенсивности люминесценции в присутствии индуктора к таковой в контроле на момент измерения и выражается в относительных единицах.

По показателям АО биосенсоров, представленных на рис. 3, можно судить о максимально эффективных концентрациях тестируемого агента. В

Таблица 1. Зависимость АО биосенсора *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) от времени инкубации с митомицином С

Инкубация, минуты	Митомицин С, 10^{-9} М	Митомицин С, 10^{-6} М
0	1	1
30	1	2
60	1	10
90	1	15
120	1.2	23
150	1.5	30
180	2	33

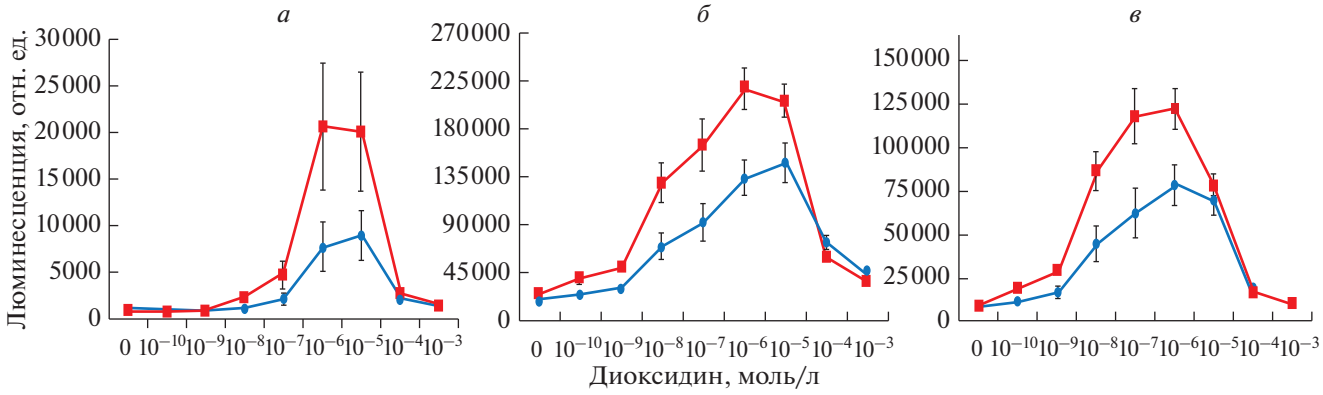

Рис. 2. Показатели интенсивности люминесценции биосенсоров PColD (*а*), PRecA (*б*) и PDinI (*в*) при действии диоксидина; экспозиция 60 (синяя линия) и 90 (красная линия) мин.

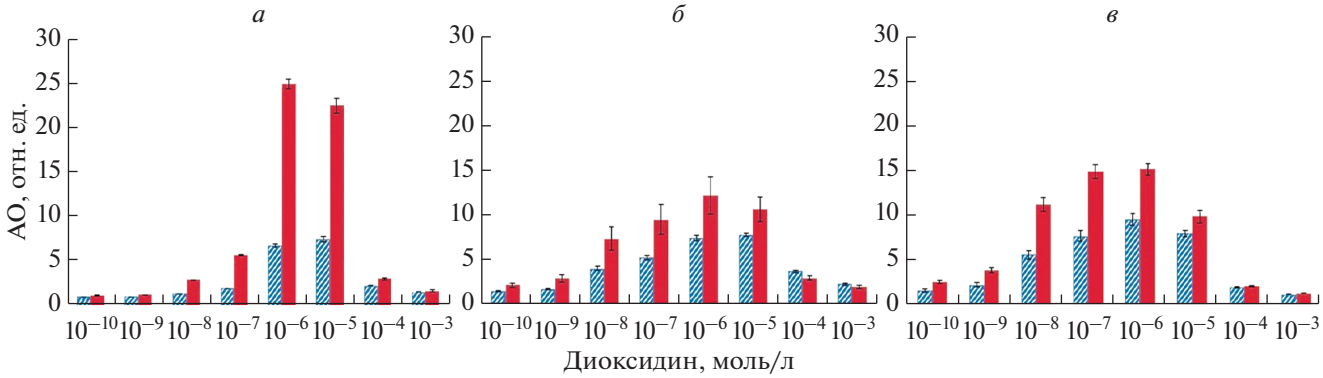

Рис. 3. Показатели АО биосенсоров PColD, PRecA и PDinI при действии диоксидина; экспозиция 60 (синяя штриховка) и 90 (красные столбики) мин.

случае диоксидина такими концентрациями являются: 10^{-6}–10^{-5} на биосенсоре PColD (АО-25.0), 10^{-6} на биосенсоре PRecA (АО-12.0) и 10^{-7}–10^{-6} на биосенсоре PDinI (АО-15). Наибольший АО наблюдается при использовании PColD. Сравнение показателей для PRecA и PDinI указывает на большую эффективность второго. Об этом свидетельствует не только величина АО, но и снижение эффективных концентраций диоксидина.

Количественные показатели амплитуды ответа lux-биосенсоров при действии каждого из исследуемых соединений приведены в табл. 2. АО биосенсора PColD при действии митомицина С, диоксидина, 4-НХО, ципрофлоксацина, налидиксовой кислоты, метилметансульфоната и перекиси водорода превышает таковую у PRecA и PDinI. Однако повышенное значение АО у PColD в случае тестирования налидиксовой кислоты, ципрофлоксацина, НММ и ММС наблюдалось при более высоких концентрацияхэтих соединений, чем на PRecA и PDinI.

Особый интерес представляет сравнение данных по АО lux-биосенсоров PRecA и PDinI, поскольку промоторы генов *rec*A и *din*I задействованы, в отличие от промотора гена *cda* (colD), на начальных этапах SOS-ответа.

Выявили, что АО PDinI более выражена, чем АО PRecA, при действии алкилирующих агентов НММ и ММС, антибактериального препарата диоксидина и цитостатиков митомицина С и *цис*-платины. При действии нитрофуранового соединения фурацилина, нитрохинолинового соединения 4-НХО, а также ингибиторов ДНК-гиразы, налидиксовой кислоты и ципрофлоксацина, различия в АО этих биосенсоров минимальны (табл. 2).

Биосенсор PDinI при действии цитостатика митомицина С показал более высокую АО (27), чем PRecA (6.9) в случае 90 мин экспозиции. В случае *цис*-платины, которая так же как и митомицин С, вызывает внутринитевые аддукты и межнитевые сшивки в ДНК, АО у обоих биосенсоров была ниже: PDinI – 8.6, PRecA – 5.1. Алкилирующий цитостатик стрептозотоцин был более активен на PDinI (АО-7.3), чем на PRecA – (АО-5.1).

Аналоги оснований тестировались в концентрациях 10^{-2}–10^{-4} моль/л. Активность 2-амино-

Таблица 2. АО биосенсоров PColD, PRecA и PDinI при действии генотоксичных агентов в течение 60 и 90 мин в условных единицах

Химическое соединение	Диапазон концентраций, моль/л	PColD		PRecA		PDinI	
		60	90	60	90	60	90
Митомицин С	10^{-8}–5×10^{-5}	22.8 (5×10^{-5})	47.1 (5×10^{-6})	5.4 (5×10^{-5})	7.0 (10^{-5})	15.0 (5×10^{-6})	26.0 (5×10^{-6})
Диоксидин	10^{-12}–4.5×10^{-3}	7.4 (10^{-5})	24.9 (10^{-6})	7.6 (10^{-5})	12.0 (10^{-6})	9.4 (10^{-6})	15.0 (10^{-6})
Фурацилин	10^{-3}–10^{-1}	1.5 (2.5×10^{-2})	4.4 (5×10^{-2})	1.9 (2.5×10^{-2})	4.0 (2.5×10^{-2})	2.2 (10^{-2})	4.8 (2.5×10^{-2})
4-НХО	2×10^{-5}–3.2×10^{-4}	18.5 (3.2×10^{-4})	40.1 (3.2×10^{-4})	5.7 (1.6×10^{-4})	9.6 (1.6×10^{-4})	3.5 (8×10^{-5})	8.3 (1.6×10^{-4})
Налидиксовая кислота	10^{-6} –10^{-2}	5.3 (10^{-2})	12.9 (10^{-2})	8.6 (5×10^{-3})	12.4 (5×10^{-3})	3.7 (5×10^{-3})	4.7 (5×10^{-4})
Ципрофлоксацин	5×10^{-8}–5×10^{-4}	7.5 (10^{-5})	11.5 (10^{-5})	5.5 (5×10^{-5})	6.5 (10^{-6})	5.2 (10^{-6})	6.7 (10^{-6})
НММ	5×10^{-4}–10^{-1}	15.7 (10^{-2})	18.6 (10^{-2})	6.8 (10^{-2})	7.9 (10^{-2})	20.0 (10^{-2})	19.6 (10^{-2})
ММС	10^{-4}–5×10^{-2}	26.8 (10^{-2})	30.1 (10^{-2})	6.8 (5×10^{-3})	8.6 (5×10^{-3})	11.3 (5×10^{-3})	15.0 (5×10^{-3})
Перекись водорода	10^{-3}–5×10^{-2}	23.1 (2.5×10^{-3})	41.3 (2.5×10^{-3})	6.3 (7.5×10^{-3})	7.5 (7.5×10^{-3})	17.6 (2.5×10^{-3})	29.2 (5×10^{-3})
цис-Платина	5×10^{-7}–10^{-4}	2.6 (10^{-4})	7.4 (10^{-4})	3.0 (10^{-4})	5.1 (10^{-4})	3.0 (10^{-4})	8.6 (10^{-4})
Стрептозотоцин	10^{-7}–5×10^{-4}	3.1 (5×10^{-5})	3.1 (5×10^{-5})	2.4 (5×10^{-5})	2.9 (5×10^{-5})	4.6 (10^{-5})	7.3 (5×10^{-6})
2-Аминопурин	10^{-4}–10^{-2}	–	2.4 (2.5×10^{-2})	–	2.9 (10^{-2})	–	2.0 (10^{-2})
5-Бромурацил	10^{-4} –10^{-2}	–	–	2.6 (10^{-2})	4.6 (10^{-2})	2.5 (10^{-2})	4.6 (10^{-2})
5-Фторурацил	10^{-4} –10^{-2}	–	–	–	–	1.8 (5×10^{-3})	3.6 (7.5×10^{-3})

Примечание. В скобках указана концентрация генотоксиканта в моль/л, “–” – нет достоверного ответа.

пурина для всех трех lux-биосенсоров определяли лишь через 90 мин инкубации. При этом Фактор Индукции (нарастание АО) составлял от 2.0 до 2.9, что свидетельствует об очень низком уровне индукции SOS-ответа. 5-Бромурацил проявил активность на PRecA и PDinI. 5-Фторурацил индуцировал SOS-ответ только у биосенсора PDinI (табл. 3).

Минимальные концентрации изучаемых соединений, вызывающие статистически достоверное повышение индуцированной люминесценции над контролем, приведены в табл. 3. В скобках приведены количественные значения уровней значимости ($p < 0.05$). Наиболее эффективными индукторами SOS-ответа по данному критерию оказались: митомицин С, *цис*-платина, диоксидин и ципрофлоксацин. Если анализировать представленные минимальные концентрации тестированных соединений в связке со значениями уровней значимости, то можно утверждать, что для НММ и ММС концентрация 10^{-3} при $p \leq 10^{-7}$ не является реально минимальной и нуждается в уточнении.

Таблица 3. Минимальные концентрации генотоксичных агентов, достоверно повышающих уровень SOS-ответа биосенсоров. Воздействие 60 и 90 мин

Химическое соединение	PColD		PRecA		PDinI	
	60	90	60	90	60	90
Митомицин С	5×10^{-8} (7.3×10^{-4})	5×10^{-8} (6.7×10^{-4})	5×10^{-7} (4.5×10^{-7})	5×10^{-8} (3.4×10^{-3})	5×10^{-8} (6.6×10^{-9})	5×10^{-8} (1.9×10^{-11})
Диоксидин	10^{-8} (2.7×10^{-2})	10^{-8} (5.2×10^{-5})	10^{-10} (1.3×10^{-2})	10^{-10} (1.6×10^{-4})	10^{-9} (1.7×10^{-4})	10^{-11} (1.5×10^{-2})
Фурацилин	10^{-2} (1.2×10^{-2})	5×10^{-3} (2.5×10^{-2})	2.5×10^{-3} (8.3×10^{-8})	10^{-3} (1.1×10^{-5})	10^{-3} (1.0×10^{-3})	10^{-3} (2.0×10^{-8})
4-НХО	2×10^{-5} (2.6×10^{-6})	2×10^{-5} (3.5×10^{-10})	2×10^{-5} (4.5×10^{-6})	2×10^{-5} (2.2×10^{-6})	2×10^{-5} (1.1×10^{-13})	2×10^{-5} (1.1×10^{-15})
Налидиксовая кислота	5×10^{-5} (6.0×10^{-4})	5×10^{-5} (1.3×10^{-4})	5×10^{-5} (4.2×10^{-5})	10^{-6} (1.1×10^{-2})	5×10^{-5} (4.3×10^{-4})	5×10^{-5} (1.5×10^{-3})
Ципрофлоксацин	5×10^{-8} (2.8×10^{-4})	5×10^{-8} (7.0×10^{-6})	5×10^{-8} (1.2×10^{-7})	5×10^{-8} (8.3×10^{-10})	5×10^{-8} (3.1×10^{-10})	5×10^{-8} (1.6×10^{-12})
НММ	5×10^{-4} (4.0×10^{-8})	5×10^{-4} (2.5×10^{-6})	5×10^{-4} (1.8×10^{-9})	5×10^{-4} (1.1×10^{-8})	5×10^{-4} (6.9×10^{-13})	5×10^{-4} (8.9×10^{-14})
ММС	10^{-4} (3.3×10^{-3})	10^{-4} (1.5×10^{-3})	10^{-4} (3.8×10^{-8})	10^{-4} (3.0×10^{-10})	10^{-4} (9.3×10^{-10})	10^{-4} (3.4×10^{-11})
Перекись водорода	10^{-3} (1.2×10^{-10})	10^{-3} (3.3×10^{-8})	10^{-3} (3.1×10^{-18})	10^{-3} (1.7×10^{-14})	10^{-3} (9.7×10^{-14})	10^{-3} (1.8×10^{-16})
цис-Платина	5×10^{-5} (8.5×10^{-5})	10^{-5} (1.7×10^{-3})	5×10^{-6} (3.7×10^{-3})	5×10^{-6} (4.1×10^{-7})	5×10^{-6} (5.6×10^{-4})	10^{-6} (1.4×10^{-5})
Стрептозотоцин	5×10^{-5} (4.7×10^{-6})	5×10^{-5} (1.2×10^{-5})	10^{-5} (6.5×10^{-9})	10^{-5} (9.7×10^{-8})	10^{-7} (3.8×10^{-7})	10^{-7} (1.8×10^{-9})
2-Аминопурин	10^{-4} (10^{-3})	10^{-4} (3.5×10^{-2})	2.5×10^{-4} (3.0×10^{-4})	10^{-4} (1.7×10^{-3})	–	10^{-4} (1.3×10^{-2})
5-Бромурацил	7.5×10^{-3} (1.9×10^{-2})	2.5×10^{-3} (1.7×10^{-2})	5×10^{-3} (3.8×10^{-2})	10^{-3} (2.2×10^{-2})	10^{-3} (10^{-2})	5×10^{-4} (1.8×10^{-3})
5-Фторурацил	–	7.5×10^{-4} (8.4×10^{-3})	–	2.5×10^{-4} (2.8×10^{-3})	2.5×10^{-4} (4.2×10^{-8})	10^{-4} (3.1×10^{-10})

Примечание. В скобках указаны значения *p*, “–” – отсутствие SOS-ответа.

ОБСУЖДЕНИЕ

В генетической токсикологии для выявления и оценки мутагенной активности химических факторов окружающей среды принят поэтапный подход. На первом этапе тестирования (этап скрининга) используются бактериальные тест-системы и клеточные культуры. На втором этапе вещества, показавшие активность на этапе скрининга, тестируются *in vivo* по способности индуцировать микроядра или хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей или крыс [12]. Для первичной оценки мутагенной активности химических соединений применяют тест Эймса *Salmonella*/микросомы [13]. Для регистрации мутагенной активности в данном тесте используется набор из пяти штаммов *S. typhimurium*, ауксотрофных по гистидину и ревертирующих к дикому типу в результате индукции обратных мутаций. Они позволяют устанавливать вероятные механизмы мутагенного действия. Большое число штаммов является одним из ограничивающих факторов применения теста Эймса для скрининга массива химических соединений. В этой связи возникает вопрос, можно ли обойтись минимальным набором тест-штаммов *S. typhimurium*, например ТА 98 и ТА 100, и включить в схему тестирования второй скрининговый метод, дополняющий тест Эймса и отличающийся простотой выполнения. В качестве такового был предложен метод, получивший название “SOS-хромотест”, с использование мштамма *E. coli* PQ37, у которого ген *lacZ* слит с промотором гена *sfi*A, входящего в систему SOS-системы [14]. Ответ штамма *E. coli* PQ37 регистрируется по результатам биохимической реакции галактозидазы с субстратом ОНФГ (о-нитрофенил-β-D-галактопиранозил). При этом из бесцветного субстрата ОНФГ высвобождается нитрофенил желтого цвета, и по интенсивной желтой окраски можно судить об активности β-галактозидазы, т.е. об уровне SOS-ответа. Ретроспективный анализ результатов тестирования 452 химических соединений в SOS-хромотесте и в тесте Эймса показал 82% совпадение результатов, то есть 378 соединений проявили одинаковую активность в обоих тестах [15].

Метод измерения SOS-ответа с помощью lux-биосенсоров *E. coli* по индукции интенсивности биолюминесценции технически более экономичен и удобен, чем колориметрическое детектирование ферментативной активности в SOS-хромотесте. При люминесцентном анализе регистрация ответа происходит по свечению бактерий и не требует дополнительных манипуляций, таких как лизис бактерий после инкубации и определение ферментативной активности. Непосредственный анализ люминесценции бактерий позволяет одновременно регистрировать зависимость SOS-ответа как от концентрации тестируемого соединения, так и от продолжительности инкубирования. Lux-тест легко поддается автоматизации.

В настоящее время для изучения генотоксичности химических агентов среды используют lux-биосенсоры PColD и PRecA. У каждого из них свои преимущества и недостатки. Например, у PColD для генетического мониторинга загрязнений окружающей среды недостает чувствительности к низким концентрациям генотоксиканта. Биосенсор PRecA характеризуется высоким уровнем спонтанной люминесценции, связанной с частичной открытостью промотора pRecA. Это снижает амплитуду ответа, необходимого для достоверной регистрации индуцированного SOS-ответа. В этой связи нами было проведено сравнение таких характеристик биосенсоров PRecA, PColD и PDinI, как амплитуда ответа и минимальная концентрация генотоксикантов, статистически значимо повышающих SOS-ответ. Биосенсор PDinI был сконструирован в настоящей работе. Белок DinI играет значимую роль в регуляции индукции как SOS-ответа, так и SOS-мутагенеза [16–18]. На начальном этапе SOS-ответа начинается синтез DinI, который, формируя комплекс с RecA на более позднем этапе SOS-ответа, ингибирует образование филаментов RecA/ssDNA, что приводит к снижению SOS-ответа [19]. Однако наличие в среде генотоксичного агента приводит вновь к усилению SOS-ответа и т.д. [16, 19].

Белок DinI участвует и в регуляции SOS-индуцированного мутагенеза. На раннем этапе SOS-ответа DinI блокирует протеолиз белка UmuD до состояния UmuD', компонента ДНК-полимеразы V, что предотвращает запуск мутагенеза в начале SOS-репарации [19, 20].

Полученные нами результаты показали, что биосенсор PDinI выгодно отличается от PRecA. Например АО биосенсора PDinI более выражен, чем АО биосенсора PRecA при действии перекиси водорода, алкилирующих агентов НММ, ММС и стрептозотоцина, а также антибактериального средства диоксидина и цитостатиков митомицина С и *цис*-платины. Антиметаболит 5-фторурацил показал активность только на PDinI. Фурацилин и 4-НХО, метаболиты которых образуют аддукты с ДНК, были более активны на PColD, чем на PRecA и PDinI. Ингибиторы ДНК-гиразы налидиксовая кислота и ципрофлоксацин были мене активны на PDinI, чем на PColD и PRecA. В целом из 13 тестированных веществ восемь более активно индуцировали SOS-ответ у биосенсора PDinI, чем у PColD и PRecA. При этом 5-фторурацил индуцировал SOS-ответ только у биосенсора PDinI. Надо отметить, 5-фторурацил, являющийся структурным аналогом пиримидина, используется в медицинской практике в качестве противоопухолевого агента. Препарат метаболизируется в опухолевой ткани с образованием 5-фторуридинтрифосфата

и 5-фтордезоксиуридина. Последний ингибирует тимидилатсинтетазу, что приводит к дефициту тимидина и ингибированию синтеза ДНК [21]. По-видимому он и в бактериальной клетке ингибирует синтез ДНК, приводящий к индукции SOS-ответа у биосенсора PDinI. Такая специфичность требует дальнейшего исследования. В результате проведенных исследований можно сделать заключение, что биосенсор PDinI может быть с успехом использован для первичного выявления потенциальных генотоксикантов по их способности индуцировать SOS-ответ в клетках *E. coli*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 190400200.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vollmer A.C., Belkin S., Smulski D.R. et al.* Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'::lux, uvrA'::lux,* or *alkA'::lux* reporter plasmids // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 2566–2571.
2. *Davidov Y., Rozen R., Smulski D.R. et al.* Improved bacterial SOS promoter&Colon: Lux fusions for genotoxicity detection // Mut. Res. 2000. V. 466. P. 97–107.
3. *Norman A.A., Hansen L.H., Sorensen S.J.* Construction of a ColD cda promoter – based SOS-Green fluorescent protein whole-cell biosensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on recA, umuDC, or sulA promoters // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 2338–2346. https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2338-2346.2005
4. *Manukhov I.V., Kotova V.Yu., Zavilgelsky G.B.* Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // Mut. Res. 2007. V. 634. P. 176–179.
5. *Song Y., Li G., Thornton S.F., Thompson I.P.* Optimization of bacterial whole cell bioreporters for toxicity assay of environmental samples // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. № 20. P. 7931–7938.
6. *Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б.* Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25. https://doi.org/10.1134/S0003683810080089
7. *Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В.* Сенсорные биолюминесцентные системы на основе *lux*-оперонов для детекции токсичных веществ // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 10. С. 15–20.
8. *Ahn J.-M., Hwang E.T., Youn C.-H. et al.* Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages // Biosensors and Bioelectronics. 2009. V. 25. P. 767–772. https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.025
9. *Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилев С.К.* Lux-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // Экол. генет. 2016. Т. 14. С. 52–62. https://doi.org/10.17816/ecogen14452-62
10. *Van Dyk T.K., Rosson R.A. Photorhabdus luminescens lux CDABE* promoter probe vectors // Meth. Mol. Biol. 1998. V. 102. P. 85–95.
11. *Weng M.-W., Zheng Y., Jasti V.P. et al.* Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model // Nucl. Ac. Res. 2010. V. 38. № 20. P. 6976–6984.
12. *Абилев С.К., Глазер В.М.* Генетическая токсикология: итоги и проблемы // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 81–93. https://doi.org/10.7868/S0016675813010025
13. *McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N.* Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 12. P. 5135–5139.
14. *Quillardet P., Huisman O., D'Ari R. et al.* SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K12 to measure genotoxity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 19. P. 5971–5975. https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.5971
15. *Quillardet P., Hofnung M.* SOS chromotest: A review // Mut. Res. 1993. V. 297. P. 235–279. https://doi.org/10.1016/0165-1110(93)90019-j
16. *Cox M.M.* Regulation of bacterial RecA protein function // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2007. V. 42. № 1. P. 41–63. https://doi.org/10.1080/10409230701260258
17. *Galkin V.E., Britt R.L., Bane L.B. et al.* Two modes of binding of DinI to RecA filament provide a new insight into the regulation of SOS response by DinI protein // J. Mol. Biol. 2011. V. 408. P. 815–824. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.046
18. *Voloshin O.N., Ramirez B.E., Bax A., Camerini-Otero R.D.* A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: A negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA // Genes. Dev. 2001. V. 15. P. 415–427. https://doi.org/10.1101/gad.86290
19. *Yasuda T., Morimatsu K., Kato R. et al.* Physical interactions between DinI and RecA nucleoprotein filament for the regulation of SOS mutagenesis // EMBO J. 2001. V. 20. P. 1192–1202. https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1192
20. *Yasuda T., Morimatsu K., Horii K. et al.* Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease by DinI // EMBO J. 1998. V. 17. № 11. P. 3207–3216. https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3207
21. *Longley D.S., Harkin D.P., Johnston P.G.* 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies // Nature Rev. Cancer. 2003. V. 3. № 5. P. 330–337. https://doi.org/10.1038/nrc1074

Specific Lux-Biosensors of *Escherichia coli* Containing pRecA::lux, pColD::lux and pDinI::lux Plasmids, for Detection of Genotoxic Agents

S. K. Abilev[a], V. Y. Kotova[b], S. V. Smirnova[a, *], T. N. Shapiro[a], and G. B. Zavilgelsky[b]

[a]*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*

[b]*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 117545 Russia*

**e-mail: s.v.smirnova.genet@gmail.com*

The lux-biosensor of *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) was constructed and a comparative study of the SOS-response of 3 biosensors: *E. coli* MG1655 (pRecA::lux), *E. coli* MG1655 (pColD::lux) and *E. coli* MG1655 (pDinI::lux) under the action of genotoxic agents was performed. Listed biosensors were named, respectively, PRecA, PColD and PDinI. The response amplitude (RA) was chosen as an indicator of the SOS-response level of lux biosensors. It was shown that RA of PDinI biosensor was more expressed than RA of PRecA biosensor under the action of hydrogen peroxide, alkylating agents such as NMU, MMS and streptozotocin, antibacterial agent such as dioxidine and cytostatics such as mitomycin C and cisplatin. Antimetabolite 5-fluorouracil showed activity only with PDinI. Furatsilin and 4-NQO, whose metabolites form adducts with DNA, were more active on PColD than on PRecA and PDinI. DNA gyrase inhibitors such as nalidixic acid and ciprofloxacin were less active on PDinI than on PColD and PRecA. Overall, among 13 tested substances, 8 more actively induced SOS response in the PDinI biosensor than in PColD and PRecA. At the same time, 5-fluororacil induced SOS-response only with the PDinI biosensor. It was concluded that the PDinI biosensor can be successfully used for the primary detection of potential genotoxicants by their ability to induce SOS-response in *E. coli* cells.

Keywords: lux-biosensors, *E. coli*, SOS-response, response amplitude, promotors SOS-genes, *dinI* gene, genotoxicants, alkylating agents, dioxidine, cytostatic drugs.