



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ
им. Н.И. ВАВИЛОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



**Опыт применения люминесцентных бактериальных
биосенсоров на основе штамма *Escherichia coli* K12
в генотоксикологических исследованиях**

Смирнова Светлана Владимировна

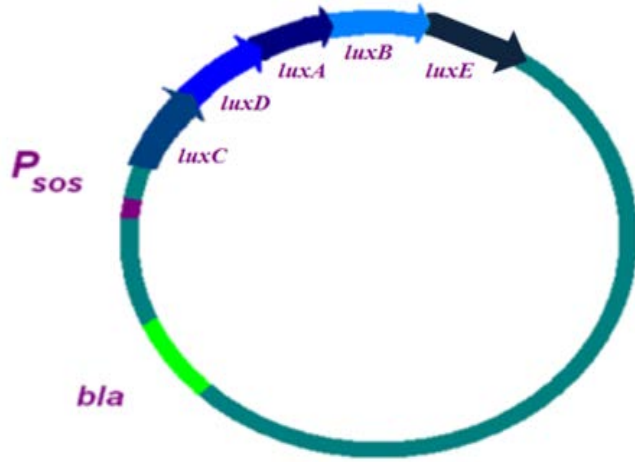
Рук. вивария, м.н.с. группы Мутагенеза и репарации ИОГен РАН

Генотоксичность – свойство химических, физических и биологических факторов повреждать структуру и нарушать функционирование генетического аппарата клеток.

Примеры ДНК-повреждающего действия:

- **Алкилирующие вещества** (метилметансульфонат (ММС), N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ), стрептозотозин) - соединения, которые реагируют с нуклеофильными (электроотрицательными) участками в молекулах нуклеиновых кислот и белков, формируя ковалентные связи, заменяя атомы водорода на алкильные группы.
- **Соединения, вызывающие межнитевые и внутринитевые сшивки ДНК** (митомицин С и *цис*-платина), приводящие к блокировке синтеза ДНК и к индукции SOS-ответа.
- **Аналоги оснований нуклеиновых кислот** (5-бромурацил, 2-аминопурин, 5-фторурацил).
- Вещества, метаболиты которых образуют **аддукты с ДНК** (4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО) и фурацилин).
- Красители, **интеркалирующие в ДНК** (бромистый этидий и 9-аминоакридин).
- **Ингибиторы ДНК-гиразы** (налидиксовая кислота и ципрофлоксацин).
- Вещества, инициирующие **свободнорадикальное окисление** (перекись водорода (H_2O_2), диоксидин), приводящее к однонитевым разрывам ДНК.
- **Ультрафиолет (UV)**, образование пиримидиновых димеров.

Лух-биосенсоры



Рекомбинантные штаммы

Escherichia coli несущие *lux*-оперон
люминесцирующей бактерии

Photobacterium luminescens

luxA кодирует α -субъединицу
люциферазы

luxB - β -субъединицу

luxCDE - комплекс редуктазы жирных
кислот (редуктазу, синтазу и
трансферазу)

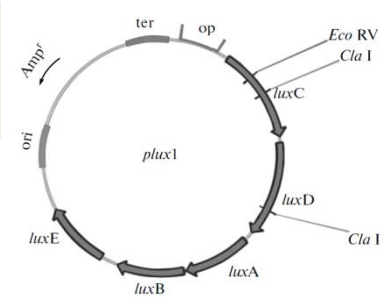
P_{sos} – промотор SOS-гена

bla – резистентность к ампициллину



Штаммы *E. coli* K12

(Получены из ГосНИИ генетики)



штамм	ПОЗИТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ	ОТВЕТ
MG1655(pKat:: <i>lux</i>)	H ₂ O ₂	пероксиды
MG1655(pSoxS:: <i>lux</i>)	пакват	супероксид анион-радикал
MG1655(pColD:: <i>lux</i>)	4-нитрохинолин-1-оксид	SOS-ответ, повреждение ДНК
MG1655(pRecA:: <i>lux</i>)	4-нитрохинолин-1-оксид	SOS-ответ, повреждение ДНК
MG1655(pDinI:: <i>lux</i>)	4-нитрохинолин-1-оксид	SOS-ответ, повреждение ДНК
MG1655(pAlkA:: <i>lux</i>)	метилметансульфонат	алкилирование ДНК

Схема эксперимента



Ночная культура
Полноценная среда
LB + ампициллин
(100,0 мкг/мл)

Разведение



10^6 клеток/мл

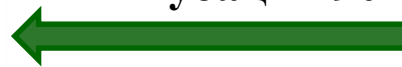
Инкубация



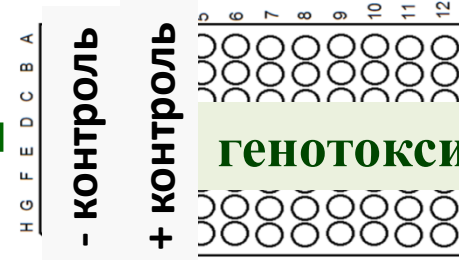
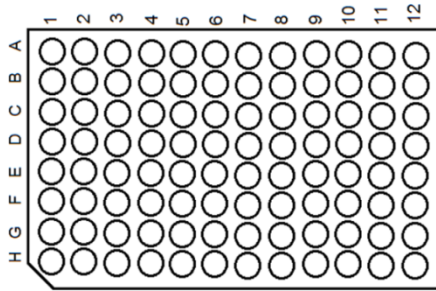
120мин
при 37 °C 120 об/мин



Инкубация 90'



при 37 °C



детекция

билюминесценции

В ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЕДИНИЦАХ СВЕТОВОГО
ПОТОКА (relative light units – RLU)



Agent	IF, I _{ind} /I ₀			Ames test
	pCol-lux	pKat-lux	pSox-lux	
H ₂ O ₂	10.01	18.53	8.60	+
Paraquat	–	2.32	4.39	+
Mitomycin C	13.80	–	–	+
4-NQO	41.80	15.88	4.29	+
2-Nitrofluorene	–	–	–	+
Furacilin	2.27	2.46	–	+
Furamag	5.73	–	–	+
Furagin	5.52	–	–	+
Furazolidone	4.53	–	–	+
Metronidazole	3.18	–	–	+
CdCl ₂	–	2.95	2.08	+
CdBr ₂	–	–	–	–
CsCl	–	–	–	–
MnCl ₂	–	–	–	–
ZnSO ₄	–	–	–	–
CuSO ₄	–	–	–	–
CoSO ₄	–	–	–	–
FeSO ₄	–	–	–	–
CrK(SO ₄) ₂	–	–	–	–
K ₂ Cr ₂ O ₇	–	–	5.34	+

Проведено тестирование на генотоксичность 47 химических соединений на тест-системе из 3 биосенсоров pSoxS-lux, pKatG-lux и pColD-lux и сравнение полученных результатов с данными об их мутагенной активности в тесте Эймса.

Для **42 из 47 протестированных соединений** показано соответствие результатов, полученных lux-тестом и тестом Эймса

Результаты тестирования веществ на биосенсоре **pColD-lux** полностью совпали с результатами **SOS-хроматеста**

Abilev, S.K.; Igonina, E.V.; Sviridova, D.A.; Smirnova, S.V. Bacterial Lux Biosensors in Genotoxicological Studies. *Biosensors* **2023**, *13*,511. <https://doi.org/10.3390/bios13050511>

No	Substance	Concentration, mmol/L	Protective activity on biosensors, %			
			pKat-lux		pSox-lux	
			prooxidant	antioxidant	prooxidant	antioxidant
Standard antioxidants						
1	Acetylcysteine	1-30	–	94 (10) *	–11 (1)	96 (20)
2	Reduced glutathione	1–30	–	95 (10)	–	98 (30)
3	Dihydroquercetin	0.1–30	–	54 (10)	–6 (5)	46 (30)
4	Lipoic acid	0.1–6	–	72 (3)	–	76 (6)
5	Spermine	0.5–20	–	92 (2.5)	–	100 (20)
6	Lycopene	0.025–1	–	91 (1)	–	83 (0.5)

Изучение про- и антиоксидантной активностей веществ

Изучено влияние **29 веществ**, включая известные антиоксиданты, противолучевые средства, аминокислоты и витамины, на окислительный стресс у биосенсоров pSoxS-lux и pKatG-lux, индуцированный паракватом и перекисью, соответственно

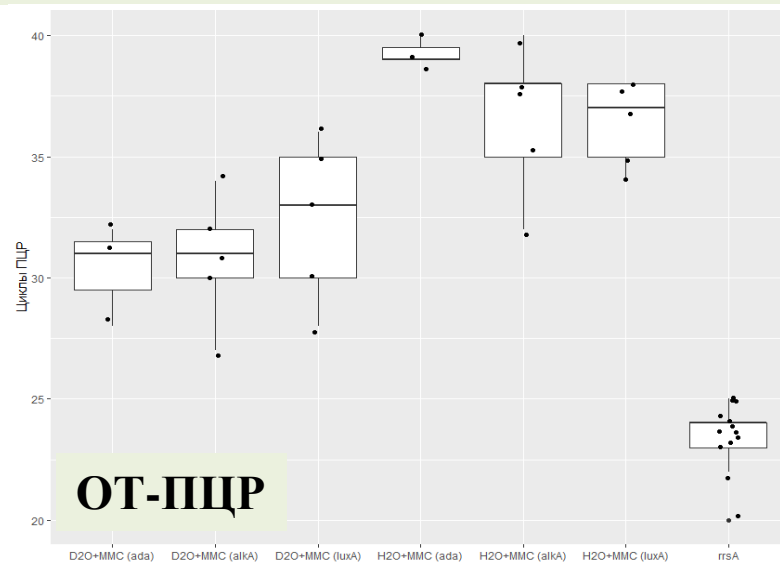
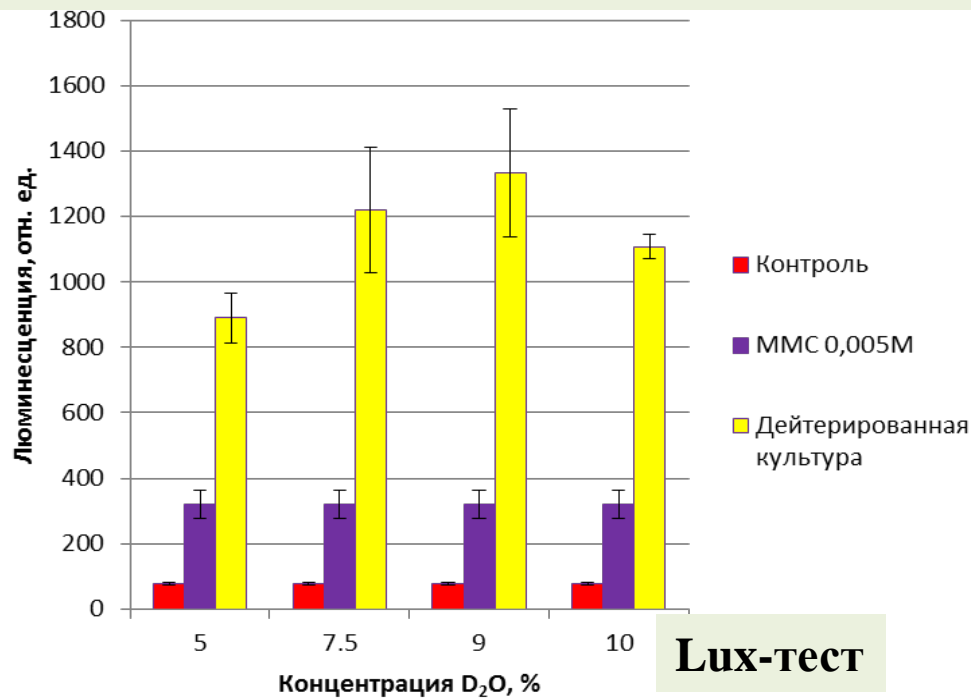
Антиоксидантную активность проявили **28 из 29** протестированных веществ

* В скобках приведены концентрации веществ, при которых наблюдались указанные значения про- или антиоксидантной активности в %

$$AA = \left(1 - \frac{I_a}{I_p}\right) \times 100$$

AA – протекторная (антиоксидантная) активность,
 Ip – интенсивность люминесценции биосенсора, индуцированная перекисью водорода или паракватом,
 Ia – интенсивность люминесценции биосенсора, индуцированная перекисью водорода или паракватом, в присутствии антиоксиданта

Изучение модифицирующего действия дейтерирования на ДНК-повреждающую активность метилметансульфоната (ММС) на биосенсоре *E. coli* MG1655 (pAlkA::lux)



Распределение показателей экспрессии генов *luxA*, *alkA* и *ada* в клетках дейтерированных и недеитированных бактерий *E. coli*, индуцированной ММС (экспрессия референсного гена *rrs* не зависела от дейтерирования бактерий)

Луминесценция дейтерированных клеток биосенсора *E. coli* MG1655 (pAlkA::lux) при индукции ответа ММС

- Smirnova, S.V., Abilev, S.K., Igonina, E.V. et al. The Effect of Deuterium on Induction of the *ada*-Regulon with Alkylating Compounds in the Cells of *Escherichia coli*. *Russ J Genet* 54, 919–924 (2018). <https://doi.org/10.1134/S1022795418080124>
- Sviridova, D.A., Smirnova, S.V. & Abilev, S.K. Deuterium Oxide Enhances Expression of the *ada*, *alkA*, and *luxA* Genes of *Escherichia coli* Induced by Methyl Methanesulfonate. *Russ J Genet* 58, 481–484 (2022). <https://doi.org/10.1134/S1022795422040135>

Заключение

- Использование lux-биосенсоров способствует экономии времени, материальных ресурсов, трудозатрат и требует минимального оборудования для считывания люминесценции.
- Сопоставимость результатов тестирования с результатами теста Эймса и SOS-хроматеста.
- Возможно создание и использование индуцибельных моделей для тестирования антиоксидантной и протекторной активности.
- Удобство для использования при масштабном предварительном скрининге.



@SVETLANA_SMIRNOF

Смирнова Светлана Владимировна

Виварий ИОГен РАН

Группа мутагенеза и репарации

s.v.smirnova.genet@gmail.com

