تطوير نظام بكتري لتحديد المطفرات في البيئة والاغذية

ثالثا : استعمال مضاهيات القواعد النتروجينية
5- برومويوراسيل

زهرة محمود الخفاجي* **غيث لطفي العزاوي****

تاريخ قبول النشر 2005/5/29

الخلاصة :

استعمل المركب 5- Bromouracil (5- BU) احد مضاهيات القواعد النتروجينية (الثايمين)لدراسة نمط استجابة عزلات النظام البكتيري G-system المكون من ثلاث عزلات بكتريا G_3, (*Bacillius*) G_{12} (*Arthrobacter*) G_{27},(*Brevibacterium*) التي تعود الى اجناس مختلفة ومقارنة الاستجابة بتلك الخاصة بالمطفر القياسي Nitrosoguanidine (NTG) اللذان استعملا تحت ظروف متشابهة وبتراكيز متدرجة.

اوضحت النتائج ان المركب يؤثر على المتبقي من الخلايا الحية بعد المعاملة لمدة 15دقيقة. اما التاثير المطفر فقد كان تاثير BU اقل من تاثير NTG في حالة تسجيل كل من المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين وان كانت الصفة الاولى اكثر استجابة. وقد سجل BU كفاءة اقل (طفرة / مايكروغرام من المطفر). اظهرت العزلة G_{27} قابلية اعلى للتطفير بالمركب BU مقارنة باستعمال NTG اذا كانت العزلة المتفوقة هي G_{12} .

المقدمة

اصبحت علاقة التطفير بعملية التسرطن واضحة اذ تشترك العمليتان بالتاثير على الجزيئات المحبة للالكترونات Electroplils والتي تتمثل بشكل رئيسي بجزيئات DNA في الانظمة الحيوية (1). وتشكل الانظمة الميكروبية بعض الانظمة المستعملة في الكشف عن المطفرات (2) حيث تستعمل في حصر مدى خطورة المسرطنات من النواحي الكمية (3، 4) وذلك لان العلاقة المذكورة اعلاه والخصوص المعتمدة عليها تعتمد على حقيقة ان عملية التطفير هي احدى مؤشرات التسرطن (5).

وقد استعملت انظمة الكشف عن المطفرات للعديد من الاغراض مثل تحديد المطفرات البيئية الناجمة عن تلوث التربة والمياه (6، 7) بالاضافة الى استخدامها في تحديد صلاحية الادوية والمواد الجديدة قبل طرحها للاسواق (8) خاصة ادوية السرطان نظرا لتداخلها مع المواد الوراثية في الجسم (9). وتعتمد معظم انظمة التطفير الميكروبي على تحديد الطفرات الراجعة لسلالات عوز غذائي مثل سلالات ايمس (Ames strains) من بكتريا *Salmonella typhimurium* هي his^- ومعاملتها بالمطفرات تعيدها الى حالة التغذية البدائية prototrophy وكذلك سلالات بكتريا *Bacillus* المستعملة في تحديد المطفرات هي his^- , met^- (10). وهناك بعض الانظمة المعتمدة على حث الطفرات المباشرة Forward mutations ولكل من الاتجاهين مساؤه ومزاياه.

وفي محاولة لتطوير نظام بكتري للكشف عن المطفرات بالاعتماد على حث طفرات مباشرة المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين باعتبارهما صفات كروموسومية في العديد من البكتريات (11) فقد تم في هذا الجزء من الدراسة استعمال مطفر من مضايهات القواعد النيتروجينية 5- Bromouracil ودراسة امكانيته في حث طفرات مقاومة للمضادات الحيوية في عزلات النظام G- system G_{27},G_{12},G_3 ومقارنة ذلك باستعمال مطفر موثق هو Nitrosoguanidine .

*دكتوراه-أستاذ مساعد- معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا/ جامعة بغداد
** معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا/ جامعة بغداد

المواد وطرق العمـــل

الاوساط الغذائية:

- وسط اكار اساس الـــدم Blood agar base من شركة England / Mast
- وسط المرق المغذي Nutrient broth من شركة Germany/Merck
- محلول التخفيف ، استعمل 0.1 % من التربتون (Oxoid) في الماء المقطر.
- محلول دارئ الفوسفات: حضر بتركيـــز 0.05 عياري وعدل الاس الهيدروجيني 5.5 باستعمال محلـــول عيـــاري مـــن حامض الهيدروكلوريك (HCl).

المضادات الحيوية:

- الستربتومايسين: اســـتعمل بـــشكل كبريتـــات الستربتومايسين Streptomycin sulphate من شركة India/Ajanta.
- الريفامبسين Rifampicin : من معمل الادوية في سامراء (SDI) / العراق.

المطفـــر : اســـتعمل (NTG) N- methyl-N- nitro- N-nitrosoguanidine /شـــركة Fluka /سويسرا.

المطفر BU 5- Bromouracil /شركة Fluka سويسرا.

العزلات البكتيرية :

عزل عدد من البكتريا من نماذج تربة من مناطق بعيدة عن مصادر التلوث والحاضرة ، تـــم إجـــراء التخافيف اللازمة وزراعتها على وسط اكر أساس الدم وحضنت بدرجـــة 37 ° م لمـــدة 24 ســـاعة للحصول على مستعمرات معزولة(12).

. **اختبار تركيز المضاد والحيوي** : تم باســـتعمال طريقة التدرج بالتركيز في الأطباق (13) وحددت حساسية العـــزلات باســـتعمال طريقـــة الأقراص الورقية (14)

اختبار الحساسية لصبغة البلور البنفسجي : استعملت تراكيـــز متدرجـــة مـــن الـــصبغة 7,6,5,4,3,2 مللغرام/مللتر وحددت حـــساسية العـــزلات البكتريـــة$_x$ باستعمال طريقة الاقراص الورقية (14) .

. **تحديد عدد البكتريا الحي (Viable count)**: تم باســـتعمال الطـــرق المعتمـــدة فـــي هـــذا المجال (15) اذ يتم تحديد العدد الحي باجراء التخافيف وزراعتها على وســـط الاكـــر المغـــذي وحضنها بدرجة 37°م لليوم التالي وحساب عـــدد المستعمرات وضربها X مقلوب التخفيف.

اختبارات التطفير :

تم تحضير مزروع لوغارتيمي للعزلات التي تم انتخابها في وسط المرق المغذي الى كثافة ضوئية OD_{600} بحدود 0.15 –0.25 اذ تتراوح الاعداد الحية بين 1 –4 x 10^7 /CFU مللتر. فصلت الخلايا عن الوســـط بـــالطرد المركـــزي وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوســـفات بـــاس هيدروجيني 5.5 ثم علقت بنفس الحجم من دارئ الفوسفات وقسمت إلى عدة أقسام بحجم 5 مللتر ، وحدد العدد الحي للخلايا في وقت الـــصفر ، ثـــم عوملت النمـــاذج بتراكيـــز متدرجـــة مـــن BU (100,75,50,10,5)مايكروغرام/مللتر لمـــدة 15 دقيقة بدرجة 37° م ، بعد ذلك فصلت الخلايا من المحلول وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات ثم علقت وحدد العدد الحي بعد المعاملة مباشـــرة ،وكذلك زرعت النماذج على أوساط حاوية علـــى الستربسومايسين والريفامبسين لتحديد الطفـــرات المقاومة . ثم حصنت النماذج بدرجة37° م لليـــوم الثاني لغرض التعبيـــر الظـــاهري Phenotypic expression (15) وفي اليوم التالي تـــم تحديـــد عدد الخلايا الحي وكذلك تم تحديد عدد الطفـــرات المقاومة للمـــضادات الحيويـــة الستربتومايـــسين ،الريفاسين ، الستربتومايسين + الريفامبسين (12)

الحسابات :

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة (16)

1. تحـــديـــد الجـــزء الحـــي المـــتبقي **(Sx) Survival fraction**

$$Sx = Ns/No$$

x تركيز المطفر

Ns عدد الخلايا المتبقية بعد المعاملة مباشرة

No عدد الخلايا الحية فـــي نمـــوذج الـــسيطرة (بدون معاملة)

2 . حدد Lethal hits (Hx) وفق المعادلة

$$Sx = exp\ [- Hx]$$

3 . تردد الطفرات **(Mx) Mutant frequency**

$$Mx = N_m x/No$$

$N_m x$ عدد الطفرات المستحثة عند التركيز

4. حاصل الطفرات **(Yx) Mutant yield**

$$Yx = N_m x\ /No$$

5. أعلـــى حاصـــل للطفـــرات عند تركيز معين أو عند اقل تركيز مستعمل Y_{max}

6. قابليـــة الخلايا للتطفيـــر النسبيـــة **(*Rmt*) Relative mutability**

$$Rmt = Y_{max}/Hx$$

7. حساسيـة التطفـــير النسبيـــة **(*Rms*) Relative mutational sensitivity**

$$Rms = Y_{max}/x$$

8. كفاءة المطفر **Mutagen efficiency**

Mut . Eff. =No. of mutant /µg mutagen

النتـــائج والمنـــاقشة

المركـــب 5-Bromouracil (BU) مـــن المطفـــرات المضاهيـــة او المشابهـــة للقواعـــد (Base analogue) اذ يـــشابه الثـــايمين (5-methyl uracil) وللمركب فعاليات مختلفة فـــي التاثير على DNA ، ففي حالة Ketoform يمكن ان يحل محل الثايمين الـــذي يمكـــن ان يـــرتبط بالادنين ولذلك لا يؤدي الى حالة التطفير ، فـــي حين ان الشكل enol form فانـــه يـــزدوج مـــع الكوانين بدلا من الادنين وبذا تتحول بعد دورة من التـــضاعف A-T الـــى G-C (16،17،18) وللمركب وزن جزئي 190.99. وقـــد اســـتعمل بتراكيز متدرجة لمعاملة عزلات النظام التطفيري المكون من ثلاثـــة عـــزلات G_{12} *Bacillius* G_3 *Arthrobacter* G_{27}, *Brevibacterium* لمدة 15 دقيقة بدرجة 37°م .

ويوضح (الشكل1) تاثير المركب علـــى الجـــزء المتبقي مـــن الخلايـــا الحيـــة Survival ($S\chi$) fraction بعد المعاملة بمباشرة وما يقابلها مـــن اهداف القتل فـــي الخليـــة Lethal hits ($H\chi$) . وبالنسبة للعزلات الثلاثة يلاحظ انخفاض الجـــزء المتبقي حيا بعد المعاملة مباشرة والذي يرافقه زيـــادة في عدد مواقع القتل. وتمثل عملية قياس قتل الخلايـــا اول الخطوات في تحديد تاثير المطفرات (16).

اما التاثير المطفر في حث الطفـــرات المقاومـــة للمضادات الحيوية موضحة في (الشكل2) بالنسبة للطفـــرات المقاومـــة للستربتومايـــسين (10 مـــايكروغرام/ مللتـــر)والريفامبـــسين (20 مايكروغرام/ مللتر)، ويلاحـــظ ان NTG اكثـــر تاثيرا في زيادة عدد الطفرات / مللتر بشكل عـــام لنوعي المضادات الحيوية وربما يعود ذلك الى ان مركب BU يحتاج لن يكون في محـــيط الخلايـــا اثناء نموها وتضاعف موادها الوراثية (15) ولكن قد يكون نوع الخلايا تاثيرا في الاســـتجابة مثـــل استجابة العزلة G_{12} اثناء حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين وهـــذه العزلـــة حـــساسة جـــدا للاستجابة لمطفرات اخرى (12).

وقد قيست قابلية المطفر فـــي اعطـــاء حاصـــل للطفرات $Y\chi$ عند اقل تركيز مستعمل (Ymax) ومقارنة ذلك بالمطفر القياســـي NTG والنتـــائج موضحة في (الشكل3) ، ويلاحظ ان العزلة G_{12} كانت اكثر العزلات استجابة وقد فاق تـــاثير BU فيهـــا تـــاثير NTG بالنـــسبة للمقاومـــة للستربتومايسين .

وتنص القواعد الخاصة باعتبار المواد المطفرة انه لابد ان يكون هناك زيادة مضطردة فـــي تـــردد الطفرات ($M\chi$) مع زيادة تركيز المادة المستعملة (2،16)، لذلك حسب تردد الطفـــرات المـــستحثة بالمركب BU الذي درس في عـــزلات النظـــام ومقارنة ذلك بالـــ NTG والنتائج موضحة فـــي (الشكل4) وذلك يعود الى ان الظروف المطبقـــة للتطفير بمركب BU لم يكـــن تحـــت الظـــروف المثالية وانما تـــم تحديـــد الظـــروف للمقارنـــة ، ويلاحظ ان المركب NTG حث طفـــرات اكثـــر مقاومة للريفامبسين بالاضافة الى حثه الى طفرات مضاعفة مقاومة للستربتومايـــسين والريفامبـــسين (12).

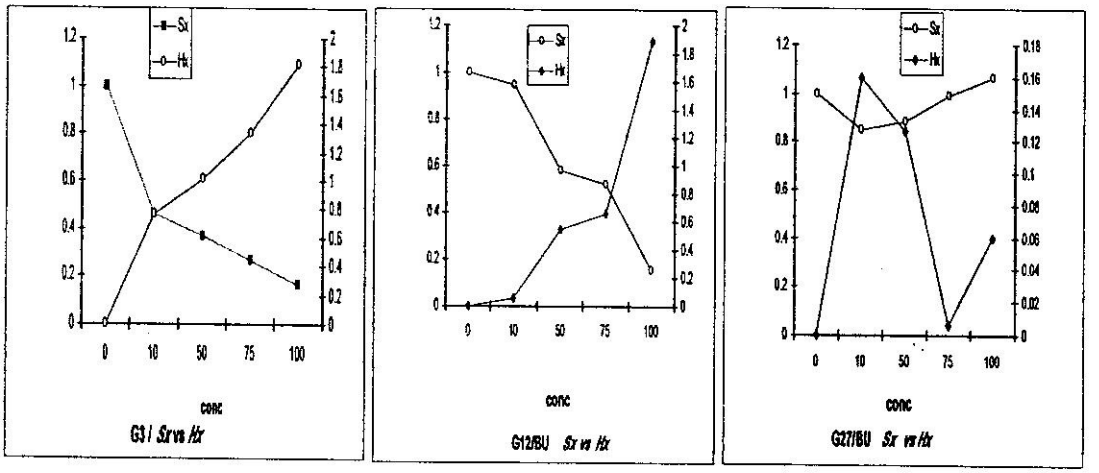
اما كفاءة BU ومقارنة ذلك بالمطفر NTG والتي تحدد بحساب عدد الطفرات المستحثة لكل وحـــدة وزنية (10) فنتائجها موضحة فـــي الـــشكل (5) للطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبـــسين على التوالي. ويتضح ان BU ذو فعالية منخفضة في حث الطفرات المقاومـــة للريفامبـــسين فـــي العزلات الثلاثة وذلك ربما يعود الـــى الظـــروف المطبقة والتي يتوقع ان يتحـــسن أدائـــه بتغييـــر الظروف ، اما فيما يخص العزلة G_{12} التي كانت اكثر العزلات في عدد الطفرات (شكل4)، ويلاحظ ان الكفاءة كانت باقل التراكيـــز المـــستعملة (10 مايكروغرام/مللتر) أي انه بالاضافة الى حاجـــة الخلايا للنمو مدة طويلة بوجود المطفر ان يستعمل المطفر بتراكيز واطئة ليـــتمكن مـــن الانـــدماج (13،17).

من جهة ثانية فان قابليـــة العـــزلات للاســـتجابة للمطفـــرات Relative mutability (*Rmt*) موضحة فـــي (الـــشكل6) للطفـــرات المقاومـــة للستربتومايسين والريفامبسين فيلاحظ ان العزلـــة G_3هي قليلة الحساسية للتطفير بمشابهات القواعد ولكن هذا الصنف من المطفرات ظهر تاثيره فـــي العزلة G_{27} ، اما معاملة بالـــ NTG فيلاحظ ان العزلـــة G_{12} هـــي الاكثـــر قابليـــة للتطفيـــر

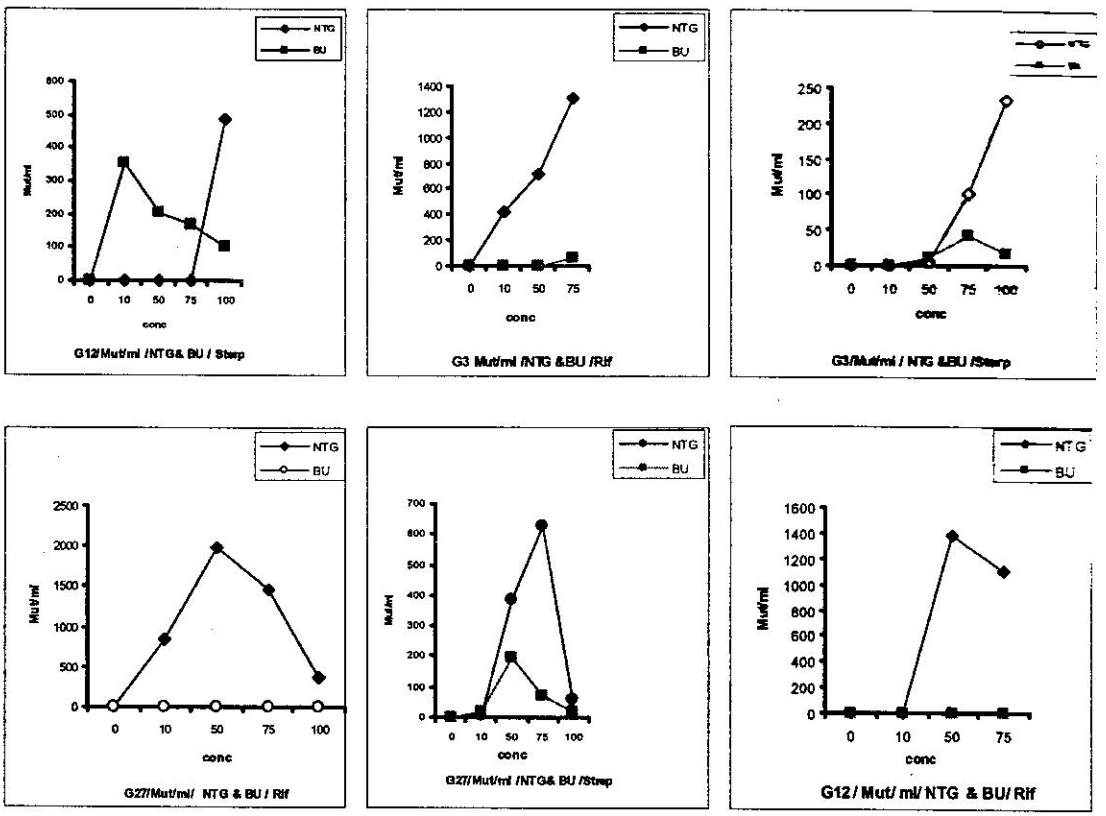
بالمواد المؤللكلة Alkayliing Agent مثل NTG (15،17) اما حساسية العزلات النسبية (Rms) Relative mutational Sensitivity فموضحة في (الشكل7) للمطفر BU وللمعاملة المقارنة NTG ، ويلاحظ تفوق G_{12} في حساسيتها عند استعمال NTG اما بالنسبة للـ BU فهي الاكثر حساسية عند استعمال مقاومة الستربتومايسين .

ويلاحظ من مجمل النتائج اعلاه ان العزلات تختلف فيما بينها من ناحية المؤشرات الخاصة بالفعاليات العامة والتي تتمثل بالجزء المتبقي $S\chi$ وعدد الاهداف المميتة $H\chi$ وهذا المؤشر يستعمل كتجربة اولية لتوضيح تاثير المواد (كما ذكر انفا) لان حدوث القتل والتطفير وان كانت هي عمليات او احداث مستقلة عن بعضها ولكن مؤشر قتل الخلايا يؤخذ كخطوة اولى في مثل هذه الدراسات (16). وعند قياس المؤشرات الوراثية يلاحظ ان عزلات النظام التي تنتمي الى اجناس مختلفة (12) توفر نظاما اوليا يمكن استعماله لاجراء عمليات المسح للمواد المختلفة. ومن الدراسات المسحية التي اجرتها EPA (2) والتي قسمت المواد الى عدة اصناف يقع BU ضمن الصنف 23 الذي يضم مشتقات البيورينات والبريميدينات فهو صنف غير واضح المعالم حيث تتراوح المواد الممسوحة بين مواد ذات نتائج موجبة في السلالة TA 1535 *S.typhimurium* الى سالبة باستعمال السلالة TA98 بالاضافة الى وجود نتائج لبعض المواد غير محددة (nondefinitive) SALT عند استعمال السلالة TA100 . وعليه فان سلالات النظام الموضحة في الدراسة الحالية تكون مفيدة وذلك لان الجهات المشرعة والمختصة توصي بعدم الركون الى استعمال نوع واحد من الاحياء او نظام واحد (10)، اذ لايوجد نظام يمكنه الكشف عن كل المطفرات (19 ،20)، واذا كانت مادة ما مطفرة في نظام معين فهذا لايعني انها تكون مطفرة في نظام اخر (2،19).

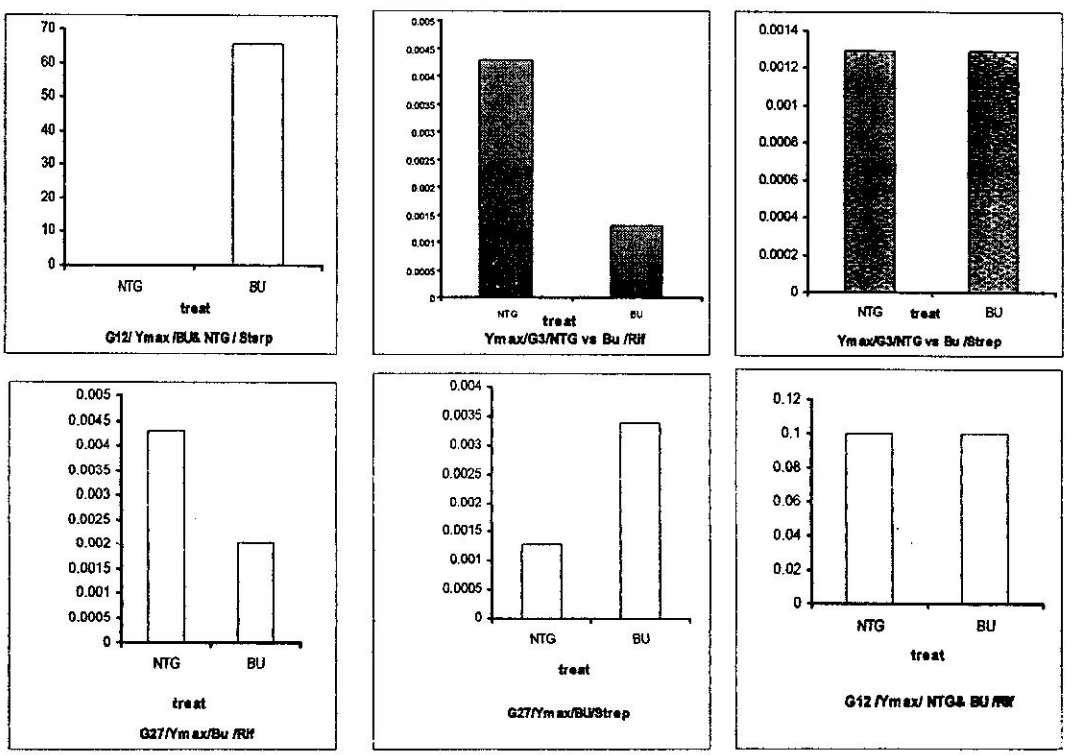
كما ان النتائج المسجلة باستعمال عزلات نظام G-system قد تكون مجدية لانها تعتمد الطفرات المباشرة والتي لها ميزات مفيدة خاصة عندما تستعمل للكشف عن مواد جديدة لاتعرف اليه تاثيرها (20) اذ ان مثل هذه المواد قد تكون سالبة عند استعمال انظمة الطفرات الراجعة (20،21).



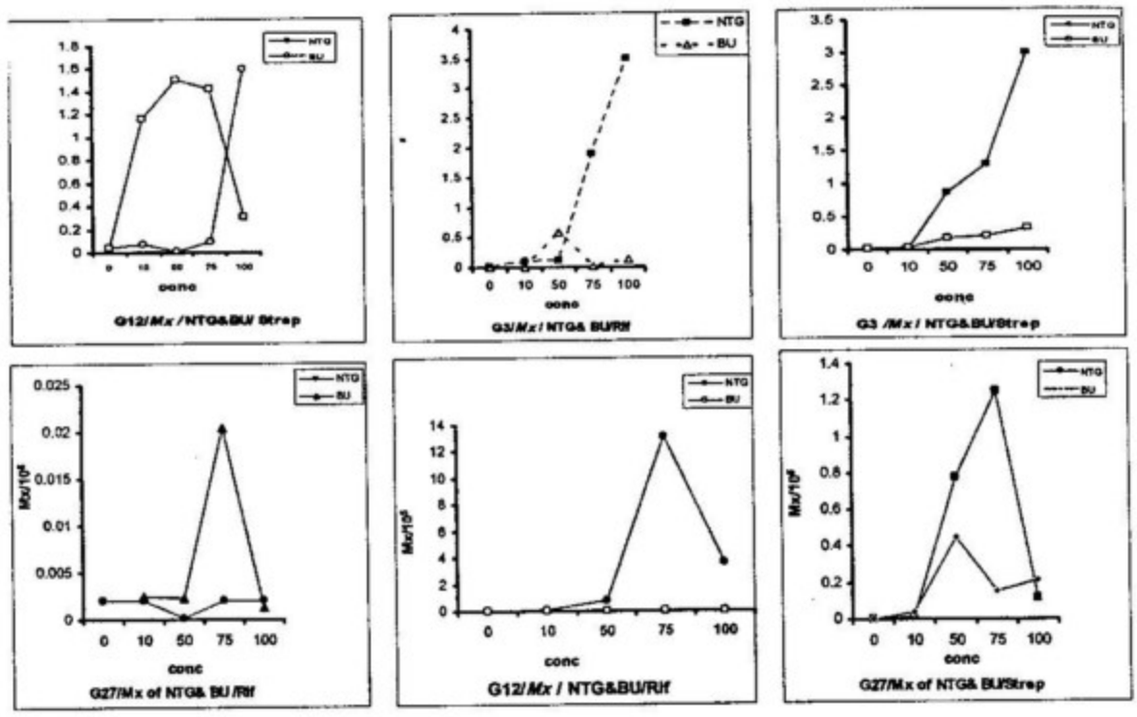
شكل 1 : تاثير التراكيز المتدرجة من BU على الجزء المتبقي من الخلايا Sx وما يقابله من Hx عاى العزلات الثلاث



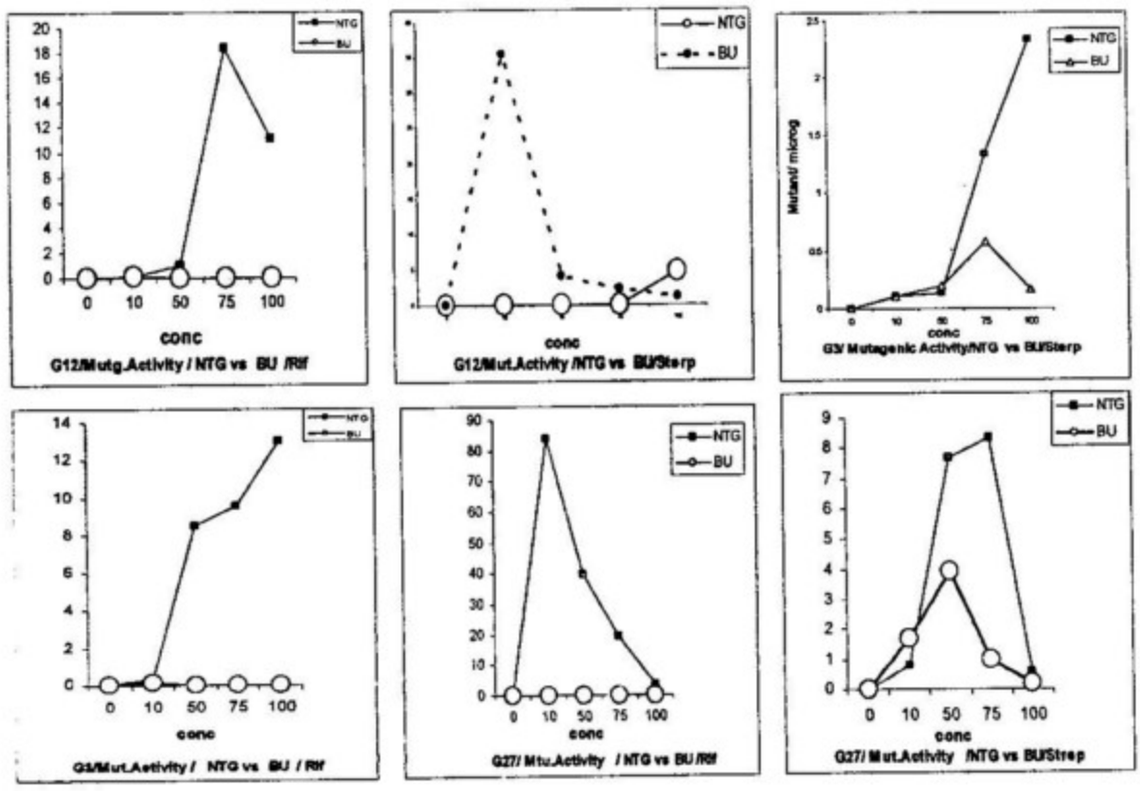
شكل 2 : حث الطفرات / مللتر بتأثير المطفر BU مقارنة NTG



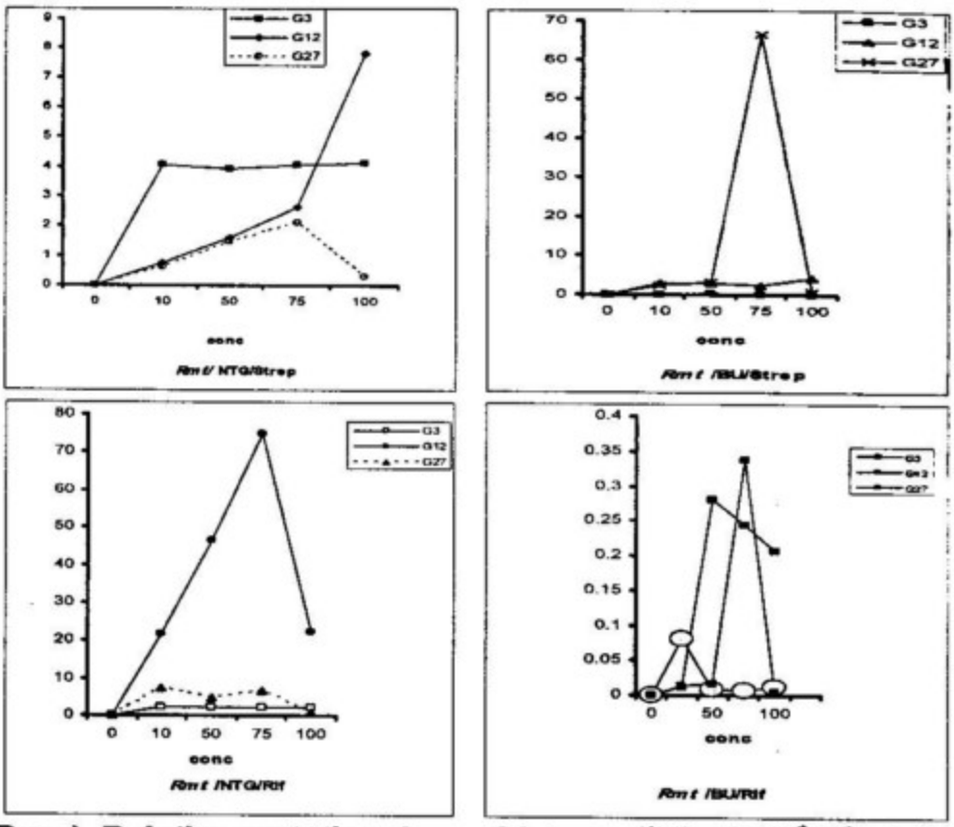
شكل 3 : تأثير اقل تركيز من BU مايكروغرام على حاصل الطفرات Ymax مقارنة بالـ NTG



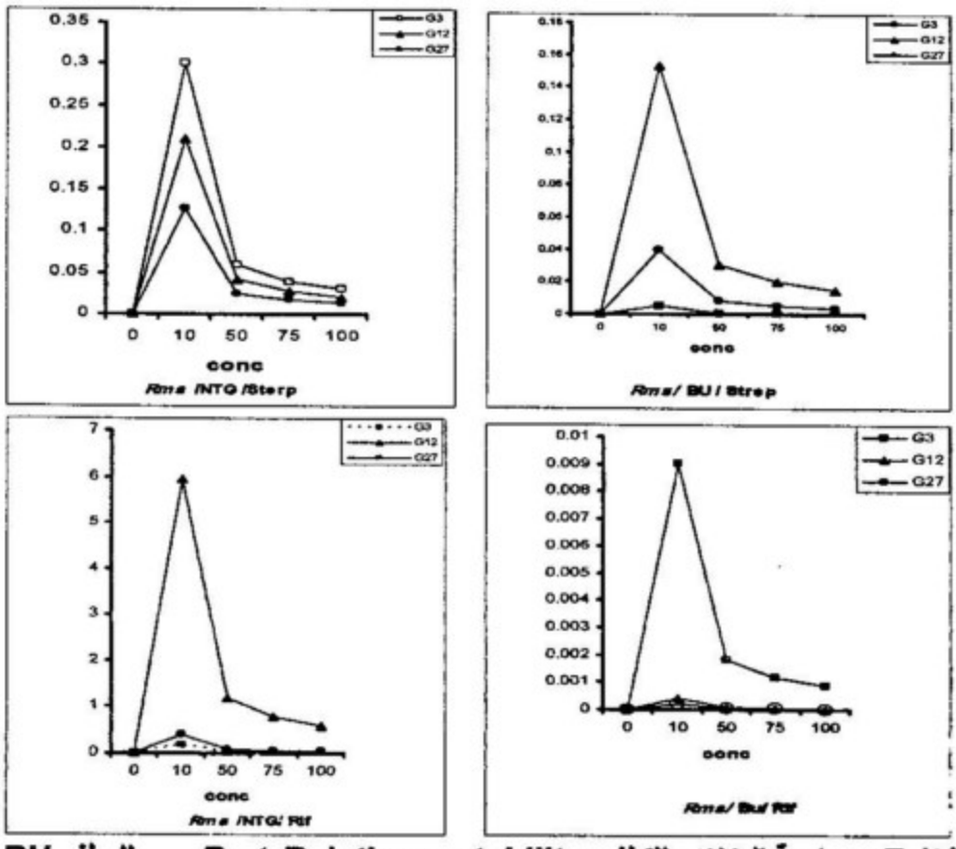
شكل 4 : تردد الطفرات *Mx* المستحثة بالـ BU مقارنة بالـ NTG



شكل 5 : الفعالية التطفيرية (طفرة / مايكروغرام) للمطفر BU مقارنة بالـ NTG



شكل 6 : قابلية العزلات للتطفير (*Rms*) Relative mutational sensitivty
بأستعمال المطفر BU مقارنة بالـ NTG



شكل 7: حساسية العزلات للتطفير *Rmt* Relative mutability للمطفر BU و NTG

References

1- Song,P.S., Ou,C.N.&Tapley ,K. 1981.Photoactivationof Furocoumaryl Carcinogenes/Mutagenes & their Intercections with Nucleic Acids.*In* "Microbial Testers:Probing Carcinogenesis".Ed.I.C.Felkner,Marc el Dekker: New York,Basel.

2- Kier,L.D.,Brusick,D.J.,Auletta, A.E.,Halle,E.S.,Brown,M.M.,Sim mon, V.F.,Dunkel,V.,McCan,J.,Mortelman .S,K.,Prival,M.,Rao,T.K. & Ray, V.1986.The *Salmonella typhimurium* /mammalian microsomal assay: A report of the U.S.Environmental Protection Agency Gene-Tox program.Mut.Res,*168*:69-240.

3- Swenson,D.H. & Kadlubar,F.F.1981.Properties of Chemical Mutagens & Chemical Carcinogens in Relation to their Mechanisms of Action.*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis". Ed.I.C.Felkner.Marcel Dekker:New York,Basel.

4- McMahon,R.E.,Cline,J.C. & Thompson,C.Z.1979. Assay of 855 test Chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens Cancer. Res.*39*:682-693.

5- Gericke,D.1983.Microbiological short- time test for the evaluation of mutagenic potential of chemical substances.Naturwissenschaften .*70*:173-179.

6- Word,J.B.,Rinkus,S.J.& Legator,M.S.1981.Strategies for Ouercoming the Deficiencies of Microbial Activation Systems for Detecting Chemical Mutagens.*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis". Ed.I.C.Felkner-Marcel Dekker:New York, Basel.

7- Watanabe,T. & Hirayama, T.2001.Genotoxicity of soil.J. Health Sci.*47*: 433-438.

8- Rao,K.S.,Xu,Y.,Shaw,E.S.& Parton,J.W.2004.Mutagencity testing applied for regulation of developing products. Curr. Separations.*20*: 141-144.

9- Nath,J.& Krishna,G.1998.Safety screening of drugs in cancer therapy. Acta Haematologica.*99*:138-147.

10- Felkner,I.C., Laumbach ,A.D. & Harter,M.L.1981.Development of a *B.subtilis* system to screen Carcinogens /Mutagens: DNA-Damaging & Mutation Assays.*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis." Ed.I. C.Felkner .Marcel Dekker: New York, Basel.

11- Coleman, D.C., Pomeroy, H. ,Estridge,J.K.,Keane,C.T.,Cafferky, M.& Foster. T.J.1985. Susceptibility antimicrobial agents & analysis of plasmids in gentamicin & methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Dublin hospitals .J.Med. Microbiol.*20*:157-167.

12-Al-Azawi, G.L., Al-Khafaji, Z.M., Al-Mashadani,W.Y.& Al-Hassan,E. A.M.:Developing of bacterial mutagentic assay system for detection of environmental & food mutagens.In press.

13- Szybalski, W.1952.Microbial selection: I-Gradient plate technique study of bacterial resistance. Science 16:46 – 48.

14. Barry,A.L. 1986.Procedures for Testing Agents in Agar Media ". Ed.V. Lorran.2nd Edition. Williams &Wilkins: Baltimore, London.

15- Miller , J.H.1972. Experiments in Molecular Genetics.Cold Spring Harbor Laboratory: New York.

16- Eckardt,F. &Haynes ,R.H .1981 .Quantitative Measures of Induced Mutagenesis.*In* "Short-Term Tests for Chemical Carcinogens."Eds.H. F.Strch & R.H.C.San.Springer-Verlag:New York,Berlin.

17- Stent, G.S.&Calendar, R.1978. Molecular Genetics-2nd Edition. W.H. Freeman & Comp.:San Francisco.

18- Singleton,P.& Sainsbury ,D.1978. Dictionary of Microbiology. 1st edition John Wiley & Sons:Chichester,New York.

19 - WHO,1985.Guide to Short-Term Tests for Detecting Mutagenic& Carcinogenic Chemicals. Environmental Health Criteria,51.

20 - Felkner,I.C.(Ed.).1981.Microbial Testers:Probing Carcinogenesis. Marcel Dekke:New York,Basel.

21- Matney, T.S.1981. Mutagenic Assays in Gram-Negative Bacteria for the Dection of Potential Carcinogens: Activation by Mammalian Microsomal Fractions. *In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenes" Ed. I. C. Felkner. Marcel Dekker:New York,Basel.

Developing of Bacterial Mutagenic Assay System for Detection of Environmental and Food Mutagens

III – Using Mutagenesis with Base Analogue
5 - Bromouracil

Zahra M.Al-Khafaji **Gaith L.Al-Azawi**
Genetic Engineering of Biotechnology Institute for Postgraduate Studies/University of Baghdad/ IRAQ.

Abstract

Base analogue , 5–Bromouracil used to study the response of G-system isolates G_3(*Bacillius* spp)G_{12} (*Arthrobacter* spp)& G_{27} (*Brevibacterium* spp)which belong to different genera in comparison to the effect of standard mutagen Nitrosoquanidine (NTG) , when applied at similar conditions with graudal concentrations.

Results showed that the analogue affected the survival fraction after treatment for 15 mins. The mutagenic effect of BU was lagged for that of NTG upon using streptomycin and rifampicin resistance as genetic markers, although the former was more indicative. BU recorded less effeciency (mutant / lg of mutagen) than that of comparative control (NTG).

Isolate G_{27} showed higher mutability by BU than by NTG. Using the latter G_{12} showed the highest mutability.