

5. Barca J. M., Brown M. E. Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances // J. Appl. Bacteriol.— 1974.— 37, N 4.— P. 583—593.
6. Негун Т. К. Морфологические и физиологические особенности синезеленой водоросли *Harposira fontinalis* и возможности ее использования в повышении урожайности сельскохозяйственных культур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1987.— 17 с.
7. Gruen H. E. Auxins and fungi // Annu. Rev. Plant Physiol.— 1959.— 10.— P. 405—440.
8. Fett W. F., Osman S. F., Dunn M. F. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads // Appl. Environ. Microbiol.— 1987.— 53, N 8.— P. 1839—1845.
9. Smidt M., Kosuge T. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders // Physiol. Plant Pathol.— 1978.— 13, N 2.— P. 203—214.
10. *Agrobacterium Ti* plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis / S. T. Liu, K. L. Perry, C. L. Schardl, C. I. Kado // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— 79, N 2.— P. 2812—2816
11. Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing aux mutant by genes from TR-region of the *Ri* plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* / I. A. Oflringa, L. S. Melchers, A. J. G. Regenburt-Tuin: et al. // Ibid.— 1986.— 83, N 18.— P. 6935—6939.
12. Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase genes is regulated by plant growth hormones / W. H. Langridge, K. J. Fitzgerald, C. Konec et al. // Ibid.— 1989.— 89, N 9.— P. 3219—3223.
13. Tang Y. M., Bonner J. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings // Arch. Biochem.— 1947.— 13, N 1.— P. 11—25.
14. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике // Под ред. С. И. Алиханяна.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
15. Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *Escherichia coli* / F. C. Cannon, R. C. Dixon, J. R. Postgate et al. // J. Gen. Microbiol.— 1974.— 80, N 1.— P. 227—241.
16. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам / Под ред. О. Микш.— М.: Мир, 1982.— 396 с.
17. Rigaud J. L'acide indolyl-3-lactique et son métabolisme chez *Rhizobium* // Arch. Mikrobiol.— 1970.— 72, N 2.— P. 297—307.
18. Schneider E. A., Wightman F. Metabolism of auxin in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol.— 1974.— 25.— P. 487—513.
19. Kosuge T., Heskett M. G., Wilson E. E. Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi* // J. Biol. Chem.— 1966.— 241, N 16.— P. 3738—3744.
20. *Agrobacterium T-DNA* gene I codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown gall cells / H. van Onckelen, E. Prinsen, P. Rudelsheim et al. // FEBS Lett.— 1986.— 198, N 2.— P. 357—360.
21. Reynders L., Vlassak K. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense* // Soil. Biol. Biochem.— 1979.— 11, N 2.— P. 547—548.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
 Университет, Байройт, ФРГ

Получено 27.04.90

УДК 575.224.46

Е. Л. Рубашевский, Л. Л. Лукаш, Е. Ф. Лысенко, Л. Н. Неборачко,  
 С. И. Кириленко, Ю. В. Пацковский, Т. И. Бужиевская

### ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТАХ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДОЙ pBR322, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕН ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Было показано, что плазмиды pBR322 и pBR322ins (рекомбинантная плазида, содержащая ген инсулина человека) индуцируют аберрации хромосом в культивируемых клетках китайского хомячка как на ранних сроках после трансфекции, так и в последующих поколениях клеток. Необходимо, таким образом, проводить тестирование на мутагенность молекул ДНК, создаваемых как для генотерапии наследственных болезней человека, так и для решения других задач.

© Е. Л. РУБАШЕВСКИЙ, Л. Л. ЛУКАШ, Е. Ф. ЛЫСЕНКО, Л. Н. НЕБОРАЧКО,  
 С. И. КИРИЛЕНКО, Ю. В. ПАЦКОВСКИЙ, Т. И. БУЖИЕВСКАЯ, 1990

**Введение.** Широкое применение методов переноса генов в целях изучения возможности экспрессии чужеродных генов в клетках млекопитающих поставило задачу определения уровня индуцированных мутаций в трансфицированных клетках млекопитающих [1]. В наших предыдущих исследованиях [2—4] продемонстрирована мутагенная активность ДНК вируса герпеса, ДНК бактериальной плазмиды *pBR325tk* (*tk* — ген вируса простого герпеса). Было обнаружено также [5] возрастание доли клеток с обменов хромосом в поколениях трансфицированных клеток. В связи с этим нас заинтересовал вопрос об универсальности свойства рекомбинантных плазмид индуцировать аберрации хромосом в соматических клетках млекопитающих. Рекомбинантная плазида *pBR322ins* применяется для изучения экспрессии гена инсулина человека, что и обусловило выбор мутагена в наших исследованиях.

Целью настоящей работы явилось определение частоты хромосомных мутаций в поколениях культивируемых фибробластов китайского хомячка.

**Материалы и методы.** Плазмиды *pBR322* (4,360 т. п. н.) и *pBR322ins* (7,560 т. п. н.) получены Л. Н. Неборачко и С. И. Кириленко (Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР). Ген инсулина человека, содержащий промотор без регуляторного участка, обеспечивающего тканеспецифичность экспрессии, клонирован в бактериальной плазмиде *pBR322* (*pBR322ins*).

В экспериментах на клетках китайского хомячка препараты ДНК обеих плазмид применяли в концентрации 5 мкг на 1 мл среды Игла. В качестве протектора применяли ДЭАЭ-декстран (молекулярная масса  $2 \cdot 10^6$ ) в конечной концентрации 100 мкг/мл.

Объектом исследования служили культивируемые фибробласты китайского хомячка — линия ВЦд-ii-FAF28. Характеристика фибробластов, методики трансфекции клеток и учета хромосомных мутаций описаны ранее [2, 5]. В наших экспериментах часть клеток фиксировали для получения препаратов метафазных пластинок через 24 ч после трансфекции, другую часть клеток пассировали. Фиксацию и пересев клеток очередного пассажа проводили через каждые 48 ч. Всего проведено два пересева трансфицированных культур.

Контролем служили клетки, обработанные ДЭАЭ-декстраном в той же концентрации.

Статистическую обработку результатов проводили по методу «хи-квадрат» [6].

**Результаты и обсуждение.** Индукцию хромосомных мутаций ДНК обеих плазмид изучали в двух независимых экспериментах через 24, 72 (1-й пассаж) и 120 ч (2-й пассаж) после окончания трансфекции. Всего проанализировано 1 800 метафазных пластинок не менее чем по 100 в каждом варианте.

Усредненные данные двух экспериментов представлены в таблице. Из ее анализа видно, что бактериальная плазида *pBR322* через 24 ч после окончания трансфекции достоверно повышает число метафазных пластинок с разрывами хромосом. В препаратах клеток, трансфицированных рекомбинантной плазмидой *pBR322ins*, также наблюдается достоверное превышение частоты метафазных пластинок с разрывами хромосом. Эти результаты совпадают с данными, полученными нами ранее в экспериментах с ДНК плазмид *pBR325* и *pBR325tk* [3, 5].

Появление хромосомных мутаций типа обменов, обнаруженных в препаратах 1-го пассажа, свидетельствует в пользу образования в хромосомах клеток предмутационных изменений, реализующихся в аберрации хромосом через 2—3 клеточных деления. Подобное явление было обнаружено нами при изучении мутагенной активности ДНК плазмид *pBR325* и *pBR325tk* на этом же сроке исследований [3, 5], а также на 5—7-м пассажах культивирования клеток, зараженных инактивированным ультрафиолетом аденовирусом типа 1 человека [7, 8].

На следующем сроке исследований — 120 ч после окончания трансфекции — обнаружено снижение показателей частоты метафазных пластинок с аберрациями хромосом примерно в 1,5 раза и отсутствие

аббераций хромосом типа обменов (хотя в обоих опытных вариантах показатель частоты аббераций хромосом достоверно превышал контрольный уровень). Снижение частоты аббераций хромосом на 2-м пассаже культивирования трансфицированных клеток мы наблюдали и в экспериментах с ДНК плазмид *pBR325* и *pBR325tk*. В этом плане дан-

*Частота хромосомных мутаций в культивируемых фибробластах китайского хомячка, трансфицированных ДНК плазмид pBR322 и pBR322ins\**  
*The chromosome mutations frequencies in established Chinese hamster fibroblasts, transfected by pBR322 and pBR322ins plasmids*

Вариант	Число проанализированных метафаз	Число клеток с абберациями, %			P
		Всего	Разрывы	Обмены	
24 ч					
Контроль	200	1,0 (0,095÷2,844)	1,0	0	
<i>pBR322</i>	200	10,5 (6,644÷15,114)	10,5	0	<0,001
<i>pBR322ins</i>	200	9,0 (5,439÷13,346)	9,0	0	<0,001
72 ч (1-й пассаж)					
Контроль	200	1,0 (0,095÷2,844)	1,0	0	
<i>pBR322</i>	200	13,0 (8,709÷18,001)	9,0	4,0	<0,001
<i>pBR322ins</i>	200	13,5 (9,129÷18,571)	10,0	3,5	<0,001
120 ч (2-й пассаж)					
Контроль	200	1,0 (0,095÷2,844)	1,0	0	
<i>pBR322</i>	200	6,0 (3,141÷9,703)	6,0	0	<0,05
<i>pBR322ins</i>	200	6,5 (3,511÷10,323)	6,5	0	<0,01

\* Усредненные данные двух экспериментов.

ные совпадают. Однако отсутствие на этом сроке исследования метафазных пластинок с абберациями типа обменов наблюдается нами впервые. По-видимому, такое значительное (приблизительно в 1,5 раза) снижение частоты клеток с абберациями хромосом и отсутствие на 2-м пассаже метафазных пластинок с обменами хромосом иллюстрируют процесс элиминации клеток, несущих предмутационные изменения и мутации хромосом. Таким образом, можно сделать вывод о том, что нами обнаружена способность бактериальной плазмиды *pBR322* и рекомбинантной плазмиды *pBR322ins* индуцировать абберации хромосом в фибробластах китайского хомячка на ранних стадиях после трансфекции и в поколениях клеток. Необходимо проводить тестирование на мутагенность всех рекомбинантных молекул ДНК, создаваемых в целях генотерапии наследственных болезней человека, и учитывать мутагенность рекомбинантных молекул ДНК при решении других теоретических и практических задач.

#### THE CHROMOSOME MUTATIONS IN ESTABLISHED CHINESE HAMSTER FIBROBLASTS, TRANSFECTED BY *pBR322* RECOMBINANT PLASMID CARRYING HUMAN INSULIN GENE

*E. L. Rubashevsky, L. L. Lukash, E. F. Lysenko, L. N. Neborachko, S. I. Kirilenko, Yu. V. Patskovsky, T. I. Buzhivovskaya*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
 Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The *pBR322* and *pBR322ins* (a recombinant plasmid carrying human insulin gene) plasmids have been shown to induce the chromosome aberrations both in early periods post-

transfection of Chinese hamster established cells and in subsequent cell generations. So it is necessary to test the mutagenic properties of the DNA molecules produced both for geneotherapy of human inherited diseases and for solution of other problems.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бужневская Т. И. Вирусиндуцированный мутагенез и некоторые аспекты генетической инженерии человека // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 66—72.
2. Мутагенность ДНК вируса простого герпеса и плазмиды в культивируемых клетках млекопитающих / Е. Л. Рубашевский, Л. Л. Лукаш, Т. И. Бужневская и др. // Докл. АН СССР.— 1984.— 279, № 3.— С. 752—754.
3. Рубашевский Е. Л. Плазмида *pBR325tk* как мутаген // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 76—78.
4. Rubashevsky E. L. Mutagen action of the recombinant plasmid *pBR325tk* on chinese hamster cells // XVIII EEMS Annu. Meet. (Bulgaria, Varna, October, 1988): Abstr.— Sofia, 1988.— P. 69.
5. Рубашевский Е. Л. Мутагенность вируса простого герпеса, его ДНК и рекомбинантной плазмиды *pBR325tk*: Автореф. дис... канд. биол. наук.— Киев, 1987.— 16 с.
6. Плохинский П. А. Биометрия.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970.— 367 с.
7. Бужневская Т. И. Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих.— Киев: Наук. думка, 1984.— 136 с.
8. Мутагенная активность аденовируса I типа в фибробластах китайского хомячка / Е. Л. Рубашевский, Т. И. Бужневская, И. С. Дяченко, Л. Н. Носач // IV съезд генетиков и селекционеров Украины (Одесса, май 1981): Тез. докл.— Киев: Наук. думка, 1981.— С. 152—153.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 27.04.90

Окончание. Начало см. на с. 89—92.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooper W. J., Coie A. Characterization studies of the rejoining of  $\alpha$ -particle and  $\gamma$ -ray induced double-strand acissions in mammalian DNA // Rad. Res.— 1974.— 59, N 1.— P. 262.
2. Bryant P. E., Blocher D. The effects of 9- $\beta$ -arabinofuranosyladenine on the repair of DNA strandbreaks in X-irradiated Ehrlich ascites tumor cells // Int. J. Rad. Biol.— 1982.— 42, N 4.— P. 385—394.
3. А. с. 1418339, С12 № 15/00. Ингибитор репарации двуниевых разрывов ДНК / А. И. Медведев // Бюл. изобретений.— 1988.— № 31.— С. 121.
4. Влияние природных и синтетических кислых полипептидов на нормальные и  $\gamma$ -облученные клетки китайского хомячка / А. И. Медведев, Ю. А. Манцыгин, Г. И. Ревина и др. // Радиобиология.— 1978.— 18, № 6.— С. 821—828.
5. Медведев А. И., Ревина Г. И., Кузин Л. М. Сильнокислые полипептиды как ингибиторы репарации одностранных разрывов ДНК, вызванных  $\gamma$ -облучением клеток *HeLa* // Докл. АН СССР.— 1983.— 270, № 1.— С. 232—235.
6. Bradley M. O., Kohn K. W. X-ray induced DNA double-strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 3.— P. 793—804.
7. Флеров Г. Н., Барашенков В. С. Практические применения пучков тяжелых ионов // Успехи физ. наук.— 1974.— 114, № 2.— С. 351—373.
8. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.— 263 с.

Ин-т биол. физики АН СССР, Пушкино Моск. области

Получено 26.04.90