

Л. А. Ситайло, В. Д. Науменко, В. Г. Макарова,
И. Ф. Каневский, И. И. Бубряк

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЧАТЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ЭКСТРАКТАМИ ИЗ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Предложена модельная система in vitro для изучения репарации двухцепочечных разрывов в ДНК с участием белковых экстрактов из высших растений. Система основана на исследовании возможности гомологической рекомбинации между двумя линейными фрагментами ДНК плазмиды pUC19. Результатом протекания процесса рекомбинации является восстановление структурной целостности гена lacZ плазмиды pUC19 и как следствие — голубой окраски рекомбинантов, растущих на среде с ИПТГ и Z-gal. Двухцепочечный разрыв в плазмидной ДНК моделировался с помощью рестриктаз EcoRI и BglII. Обсуждаются также возможные варианты репарации в данной системе лигированием субстратов или их негомологической рекомбинацией.

Введение. В настоящее время считается доказанным, что от эффективности репарации различных типов повреждений ДНК зависит как формирование генетических дефектов, так и сама жизнеспособность клеток. В литературе имеются многочисленные сведения об основных репарационных путях у бактерий и клеток млекопитающих, которые включают прямую репарацию, эксцизию оснований, эксцизию нуклеотидов, пострепликативную и индуцибельную репарации [1, 2]. Репарация ДНК, имея универсальный характер, свойственна также растительным клеткам, однако не исключено, что у разных организмов может проявиться ее специфика, поскольку в ходе эволюции видов, возможно, изменились и системы репарации ДНК. Очевидно, что без развития экспериментальных исследований нельзя переносить на растительные системы представления, обстоятельно развитые для клеток бактерий.

Если функционирование фотореактивации и эксцизионной репарации ДНК считается неоспоримым для клеток растений, то сведения о пострепликативной и индуцибельной репарации ДНК у растительных клеток очень ограничены. Даже у исследователей, достигших наибольшего прогресса в этом направлении, из лабораторий Велеминского, Жестяникова и Михаэлиса имеются только косвенные данные о возможности пострепликативной репарации ДНК и адаптивного ответа у растений [3—6]. До сих пор из-за методических трудностей не доказана прямо возможность репарации двунитчатых разрывов (ДР) ДНК, определяющих возникновение хромосомных перестроек у растительных клеток. Изучение репарационных процессов (в том числе и индуцибельных) весьма актуально также в связи с тем, что после аварии на ЧАЭС многочисленные популяции растений подвергаются хроническому облучению малыми дозами и выход ДР ДНК в клетках может возрастать. Один из предполагаемых механизмов репарации ДР ДНК у клеток растений — гомологическая рекомбинация. Именно для оценки возможности репарации ДР ДНК по рекомбинационному механизму мы и сконструировали модельную систему тестирования репарации *in vitro*.

Материалы и методы. Получение ДНК-субстратов для изучения репарации ДР ДНК рекомбинацией *in vitro*. В модельной системе изучения репарации двунитчатых разрывов *in vitro* с участием ядерных экстрактов из листьев гороха использовали ДНК-субстраты, производные от ДНК плазмиды pUC19. С помощью рестрикции плазмиды pUC19 по BamIII-сайту, достраивания получаемых 5'-липких концов за счет большого фрагмента Кленова в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов с последующим лигированием турых концов Т4-лигазой создана плазида

pUC19ΔBamHI, в которой нет сайта рестрикции по *BamHI*. Рестрикцией по *EcoRI*-сайту в плазмиду *pUC19ΔBamHI* вводили двухцепочечный разрыв с образованием 5'-липких концов. Полученную линейную плазмиду обозначали как ДНК-субстрат I.

С другой стороны из обычной плазмиды *pUC19* вырезали линейный фрагмент длиной 1568 п. н. по *BglII*-сайтам, включающий нормальный сайт рестрикции по *BamIII* в полилинкерной области. Этот фрагмент в дальнейшем обозначен как ДНК-субстрат II.

Выделение и частичная очистка ядерных белков из листьев гороха. Растительные ядра получали из двухнедельных проростков семян гороха, выращенных в поле на окраине Киева или же в районе 30-км зоны ЧАЭС. Обычно в одном эксперименте использовали 100 г листьев. Все последующие процедуры производили при 0—4 °С.

Тщательно промытые листья гомогенизировали в пяти объемах буфера А: 200 мМ сахароза, 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ дитиотреитол, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ), 5 мМ ε-аминокапроновая кислота (ε-АК). Гомогенат фильтровали через 4—6 слоев фильтровальной бумаги «Miracloth». Ядра из гомогената осаждали центрифугированием на К-23 (4 000 об/мин, 10 мин). Далее их суспендировали в 10 мл буфера А и наслаивали на 30—50 мл ступеньку 1,2 М сахарозы, центрифугировали (К-23, 4 000 об/мин, 20 мин). Затем осадок ядер суспендировали в буфере А, содержащем 1 %-ный тритон X-100, и отмывали ядра от примесей хлоропластов центрифугированием до исчезновения зеленой окраски супернатанта. Ядра от остатков тритона отмывали суспендированием их в буфере А с последующим центрифугированием. Полученный осадок ядер суспендировали в лизирующем буфере Б: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 2 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ ε-АК, 15 %-ный глицерин, 0,5 мМ бисульфит натрия. Лизис проводили в течение 10—20 мин.

Лизат центрифугировали на центрифуге J2-21 (20 000 об/мин, 20 мин), осадок отбрасывали, а к супернатанту постепенно добавляли сухой ПЭГ-6000 до 10 % в течение 20 мин. Снова центрифугировали (J2-21, 10 000 об/мин, 30 мин), осадок отбрасывали, а супернатант диализовали против буфера Б, содержащего 30 мМ NaCl. Диализат осветляли центрифугированием и вносили на колонку с гепарин-агарозой (15×1 см). Белки с колонки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl в диапазоне 30 мМ — 1,5 М.

Условия определения репарационной активности экстракта. Реакционная смесь (40 или 80 мкл) содержала: 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ и 100 мкМ смеси каждого из четырех дезоксирибонуклеотрифосфатов, 2 (20) мкг белка из фракции с колонки с гепарин-агарозой и эквимольное количество каждого из ДНК-субстратов I и II. Инкубацию проводили 30 мин при 37 °С. Затем ДНК очищали фенолом и осаждали спиртом, растворяли в стерильном ТЕ-буфере и трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* JM109 (*RecA*⁻, *lacZ*⁻) с последующим высевом трансформантов на чашку с верхним агаром, содержащим ИПТГ и Z-gal. В каждом случае брали компетентные клетки с одинаковой эффективностью трансформации. Как контроль использована репарационная смесь, содержащая бычий сывороточный альбумин (БСА).

Другие методы. Выделение ДНК плазмид (*pUC19ΔBamHI*), рестрикцию, элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля, лигирование осуществляли по Маниатису и др. [6]. Приготовление компетентных клеток и их трансформацию — согласно рекомендациям Ханагана [7]. Количество ДНК определяли спектрофотометрически [6]; количество белка в пробах — по Брэдфорду [9] на спектрофотометре Gilford R-250 (Англия). Для построения калибровочной кривой использовали растворы с известной концентрацией БСА (фракция V). Электрофорез белков вели по Леммли [8].

Результаты и обсуждение. Суть обнаружения репарационной ак-

тивности *in vitro* в частично очищенном ядерном экстракте из листьев гороха заключается в том, что он способствует осуществлению рекомбинации между определенным образом приготовленными субстратами ДНК, производными от *pUC19*, и как результат этого — восстановлению структурной целостности гена *lacZ* (рис. 1: электрофорез в 1 %-ной агарозе рестриктв плазмиды *pUC19*: 1 — *EcoRI/pUC19*; 2 — *BamHI/pUC19*; 3 — контрольный препарат ДНК плазмиды *pUC19* (I — суперспиральная форма мономера; II — релаксированная и никованные формы мономера; I* и II* — аналогичные формы димера плазмиды); рис. 2: электрофорез в 1 %-ной агарозе рестриктв плазмиды

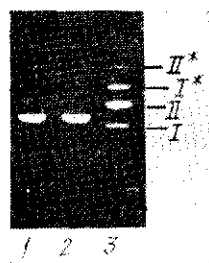


Рис. 1

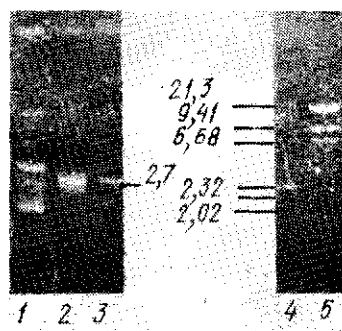


Рис. 2

pUC19ΔBamHI: 1 — *BamHI/pUC19ΔBamHI*; 2 — *PstI/pUC19ΔBamHI*; 3 — *HindIII/pUC19ΔBamHI*; 4 — *EcoRI/pUC19ΔBamHI*; 5 — λ -*HindIII* маркеры). Для количественной оценки репарационной активности (РА) белкового экстракта после трансформации компетентных клеток *E. coli* мы обозначили *A1* — количество голубых колоний, образующихся в контроле, *A2* — их количество в опыте. Тогда при $РА = A2/A1 < 1$ репарационная активность в белковом экстракте отсутствует, а в случае $РА > 1$ — присутствует.

В первой серии экспериментов получены ДНК-субстраты I и II, используемые нами далее в реакции репарации *in vitro*. Как уже отмечалось, ДНК-субстрат I представляет собой *EcoRI*-рестрикт плазмиды *pUC19ΔBamHI*, у которой смоделирована мутация *lacZ*-гена по типу сдвига рамки считывания. При трансформации такой плазмидой компетентных клеток *E. coli* JN109 (*RecA*⁻, *lacZ*⁻) и последующем их высеве на верхний агар с ИПТГ и *Z-gal* образуются белые колонии из-за структурной дефектности продукта гена *lacZ*. ДНК-субстрат II также неспособен при трансформации компетентных клеток (из-за отсутствия полной нуклеотидной последовательности гена *lacZ*) давать голубые колонии.

Следующая серия экспериментов посвящена получению частично очищенного белкового экстракта из листьев гороха. Попытки определить репарационную активность в грубом ядерном экстракте были осложнены тем, что высокий уровень нуклеазной активности приводил к деградации ДНК-субстратов, участвующих в репарации. В результате хроматографии ядерного экстракта на гепарин-агарозе удалось освободиться от значительной доли нуклеаз. Обычно в реакцию репарации брали белковые фракции, элюирующие с колонки в интервале концентраций соли 750 мМ — 1 М (рис. 3: электрофореграмма разделения белков в акриламидном геле (градиент концентрации 6—20 %) из фракций, полученных после хроматографии на гепарин-агарозе ядерного экстракта из листьев гороха: 15—19 — номера фракций с колонки, II — проскок с колонки, H — нанесение на колонку, M — маркеры молекулярной массы).

После инкубации ДНК-субстратов I и II с частично очищенным ядерным экстрактом из листьев гороха возможно появление трех про-

дуктов реакции. 1. Продукты, образовавшиеся вследствие гомологической рекомбинации между ДНК-субстратами I и II, вызывающей появление голубых колоний на чашках, содержащих ИПТГ и *Z-gal*. Это происходит за счет восстановления структурной целостности гена *lacZ* и сайта рестрикции *BamHI* в плазмиде *pUC19*. 2. Продукты, образовавшиеся в результате лигирования ДНК-субстратов I и II, кольцевые плазмиды не содержат сами по себе структурно целого гена *lacZ*, но в случае возможной их котрансформации могут возникать голубые колонии бактерий. Для проверки такого варианта был поставлен эксперимент, в котором в репарационные смеси вносили отдельно ДНК-

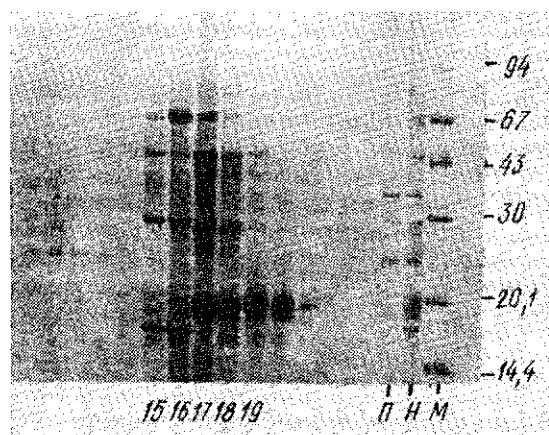


Рис. 3

субстраты I и II в концентрациях, превышающих в два раза необходимые для обычной реакции. После инкубации ДНК очищали фенолом, осаждали спиртом, растворяли в ТЕ, объединяли и трансформировали компетентные клетки. Дополнительного появления голубых колоний по сравнению с контролем в этом случае не обнаружено, что свидетельствует о низкой вероятности протекания процесса лигирования субстратов, а затем – котрансформации в применяемых условиях инкубации. 3. Продукты реакций, образовавшиеся в результате негомологической рекомбинации между ДНК-субстратами. В этом случае также не исключено появление голубых колоний (как результат функционирования *lacZ*) за счет комплементации различных участков гена, расположенных на одной плазмиде. Однако из-за того, что рекомбинация в этом случае может произойти в любом месте плазмиды должна модифицироваться ее рестрикционная карта по сравнению с исходной плазмидой *pUC19*. Рестрикционный анализ образующихся голубых колоний по *PvuII*-сайту не обнаружил изменений по сравнению с исходной плазмидой.

Итак, появление голубых колоний в разработанной нами модельной системе *in vitro* может быть обусловлено только продуктами, образовавшимися в результате гомологической рекомбинации за счет функционирования растительных белков.

Нами проведены четыре серии экспериментов, результаты которых следующие. При совместном инкубировании ДНК-субстратов в отсутствие белка растительного происхождения и последующей трансформации клеток *E. coli* получена 4 ± 1 голубая колония (контроль А1); при совместном инкубировании ДНК-субстратов в присутствии белкового экстракта (2 и 20 мкг) — соответственно 9 ± 1 ($PA=2,25$) и 12 ± 1 ($PA=3$) голубая колония. Эксперимент, проведенный с участием белкового экстракта из растений (2 мкг), выращенных в зоне ЧАЭС, дал 14 голубых колоний ($PA=3,5$).

Установленное достоверное возрастание частоты образования голубых колоний за счет белковых экстрактов из гороха даст основание за-

ключить, что растениям присущи ферментативные системы, ответственные за репарацию ДР ДНК путем гомологической рекомбинации. Не исключено также, что роль ферментативной системы репарации ДР ДНК у клеток растений возрастает в случае увеличения потока ДР ДНК у них.

Описанная модельная система *in vitro* для изучения репарации ДР ДНК достаточно чувствительна и может быть использована при исследовании эффективности репарации ДР ДНК у растений как в норме, так и при воздействии различных ДНК-тронных факторов внешней среды, в частности радионуклидов.

Резюме

Запропоновано модельну систему *in vitro* для вивчення репарації дволанцюгових розривів у ДНК за участю білкових екстрактів із вищих рослин. Система базується на дослідженні можливості гомологічної рекомбінації між двома лінійними фрагментами ДНК плазмиди *pUC19*. Результатом проходження процесу рекомбінації є відновлення структурної цілісності гену *lacZ* плазмиди *pUC19* і як наслідок — блакитного забарвлення рекомбінантів, що ростуть в присутності ІПТГ та *Z-gal*. Дволанцюговий розрив у плазмідній ДНК моделювався за допомогою рестриктаз *EcoRI* і *BglI*. Обговорюються також можливі варіанти репарації в даній системі лігуюванням субстратів чи їх негомологічною рекомбінацією.

Summary

It has been established the *in vitro* model system for investigation of DNA double stranded breaks (dsb) repair based on using of higher plants protein extracts. The system is based on searching of possibility of homologous recombination between two linear *pUC19* DNA fragments. As a result of recombination processes gene *lacZ* is restored in their structure and recombinants with blue phenotype appear on the media with IPTG and *Z-gal*.

Dsb in plasmid DNA has been provoked using *EcoRI* and *BglI* restriction enzymes. The possibility versions of recombination in proposed system by means of substrate ligation and nonhomologous recombination is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тарасов В. А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза.— М.: Наука, 1982.— 226 с.
2. Жестяников В. Д. Генетика репарационных процессов у микроорганизмов // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1985.— С. 5—149.— (Сер. Микробиология; Т. 15).
3. Veleminsky J., Gichner T., Satava J. Reduction in the frequency of N-methyl-N-nitrosourea-induced somatic mutations in *Tradescantia* by pretreatment with different doses of alkylating agents // *Mutat. Res.*— 1983.— 122, N 2.— P. 229—234.
4. Обратимость цитогенетических повреждений в растительных клетках при неравном фракционировании повреждающих воздействий. II. Воздействие редкоконизирующим излучением / Н. С. Степанян, Т. Б. Сергина, Г. Ф. Крупнова, В. Д. Жестяников // Цитология.— 1984.— 26, № 3.— С. 307—315.
5. Rieger R., Michaelis A., Nicoloff H. Inducible repair processes in plant root meristems? Below additivity effects of unequally fractionated clastogen concentration // *Biol. Zbl.*— 1982.— 101, N 1.— P. 125—130.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 332 с.
7. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *J. Mol. Biol.*— 1983.— 166, N 1.— P. 557—580.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.*— 1970.— 227, N 3012.— P. 680—685.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing in the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.*— 1976.— 72, N 2.— P. 248—254.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91