

В. М. БОРОДИНА, член-корреспондент АН СССР М. Н. МЕЙСЕЛЬ

СВЯЗЫВАНИЕ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ЖИВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Бромистый этидий (2,7-диамино-10-этил-9-фенил-фенантридин-бромид) нашел широкое применение для исследования нуклеиновых кислот. Оказалось, что это соединение специфически связывается с выделенными из клеток нуклеиновыми кислотами, образуя устойчивый флуоресцирующий комплекс. Образование комплекса сопровождается смещением спектрального максимума и увеличением квантового выхода флуоресценции. Интенсивность флуоресценции возрастает пропорционально содержанию нуклеиновых кислот ⁽¹⁾. Особый интерес представляет связывание бромистого этидия (БЭ) с двуспиральной дезоксирибонуклеиновой кислотой и двуспиральными участками рибонуклеиновых кислот. Образование этого комплекса по всем данным происходит путем встраивания, интеркаляции фенантридинового кольца БЭ между парами оснований нуклеиновой кислоты. Комплекс стабилизируется за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий ⁽²⁾. Определение термодинамических характеристик комплекса ДНК с БЭ показало наличие двух способов связывания: слабого и сильного; первое происходит часто, второе — редко. Один из этих способов связывания является ионным ⁽³⁾. При исследовании действия БЭ на живые клетки был обнаружен отчетливый мутагенный эффект. По отношению к дрожжевым организмам это соединение оказалось более сильным мутагеном, чем акридиновые производные: оно вызывает почти стопроцентное цитоплазматическое мутирование по типу *petite colonies* с утратой клетками цитохромов a^+ и b и угнетением дыхательной активности ⁽⁴⁻⁶⁾. При действии БЭ на клетки отмечено нарушение синтеза митохондриальных нуклеиновых кислот, без сколько-нибудь значительного изменения синтеза нуклеиновых кислот в ядрах ⁽⁷⁾. Электронно-микроскопическое изучение клеток, подвергнутых действию БЭ, выявило ряд структурных нарушений в митохондриях: редукцию крист, изменение проницаемости, приводящее к разбуханию митохондрий. Однако митохондрии продолжают размножаться, происходит синтез веществ, образующих мембраны, в основном за счет соединений, поступающих из цитоплазмы ^(8, 9).

Значительно менее исследовано проникновение БЭ в живые клетки и локализация в них этого соединения. По имеющимся данным, БЭ легко проникает в клетки животных и дрожжевые клетки, вызывая появление диффузной флуоресценции их цитоплазмы и более яркое свечение ядер ⁽¹⁰⁾. Между тем, *in vitro* БЭ в первую очередь связывается с циркулярными молекулами ДНК, характерными для митохондрий клеток эукариотов и нуклеоидов прокариотов. Учитывая это, мы провели флуоресцентно-микроскопическое исследование связывания БЭ с живыми дрожжевыми организмами как представителями эукариот и с бактериями — прокариот. В качестве объектов мы выбрали дрожжевые организмы *Endomycetes magnusii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* и бактерии *Bac. coli*, *Bac. mycoides*, и *Bac. megaterium*.

Использовались одно-двухсуточные культуры микроорганизмов. БЭ добавляли как в питательную среду, в которой затем выращивались клетки, так и к водной суспензии клеток. Концентрация клеток в суспензии, под-

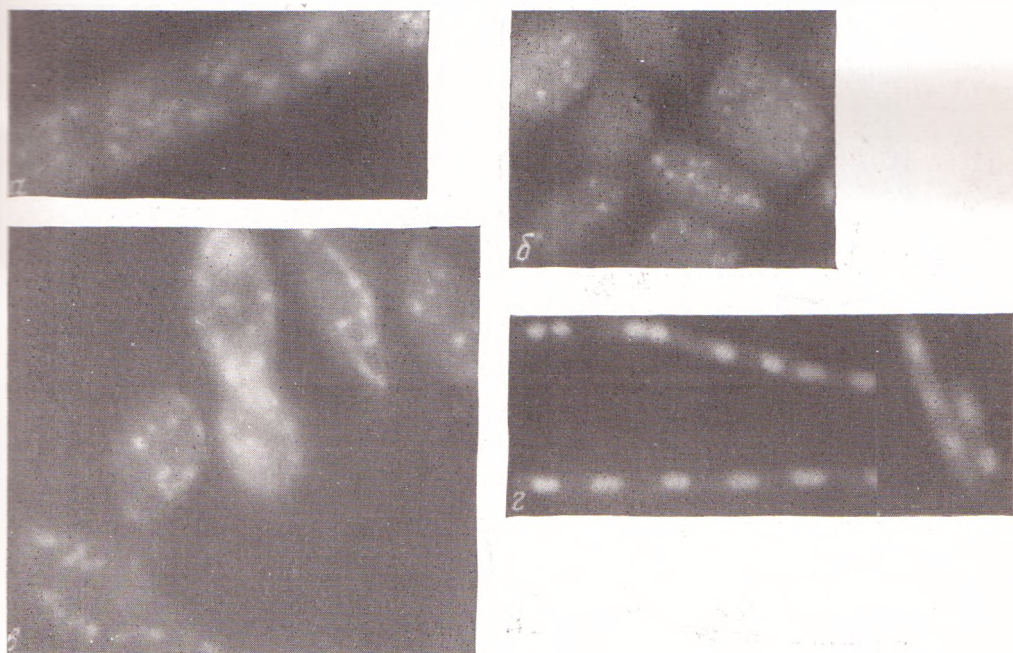


Рис. 1. Люминесценция комплекса БЗ с нуклеиновыми кислотами в клетках микроорганизмов, а — клетки *Endomycetes magnusii*, б — клетки *Saccharomyces cerevisiae*, в — клетки *Saccharomycodes ludwigii*, г — клетки *Bac. mycoides*

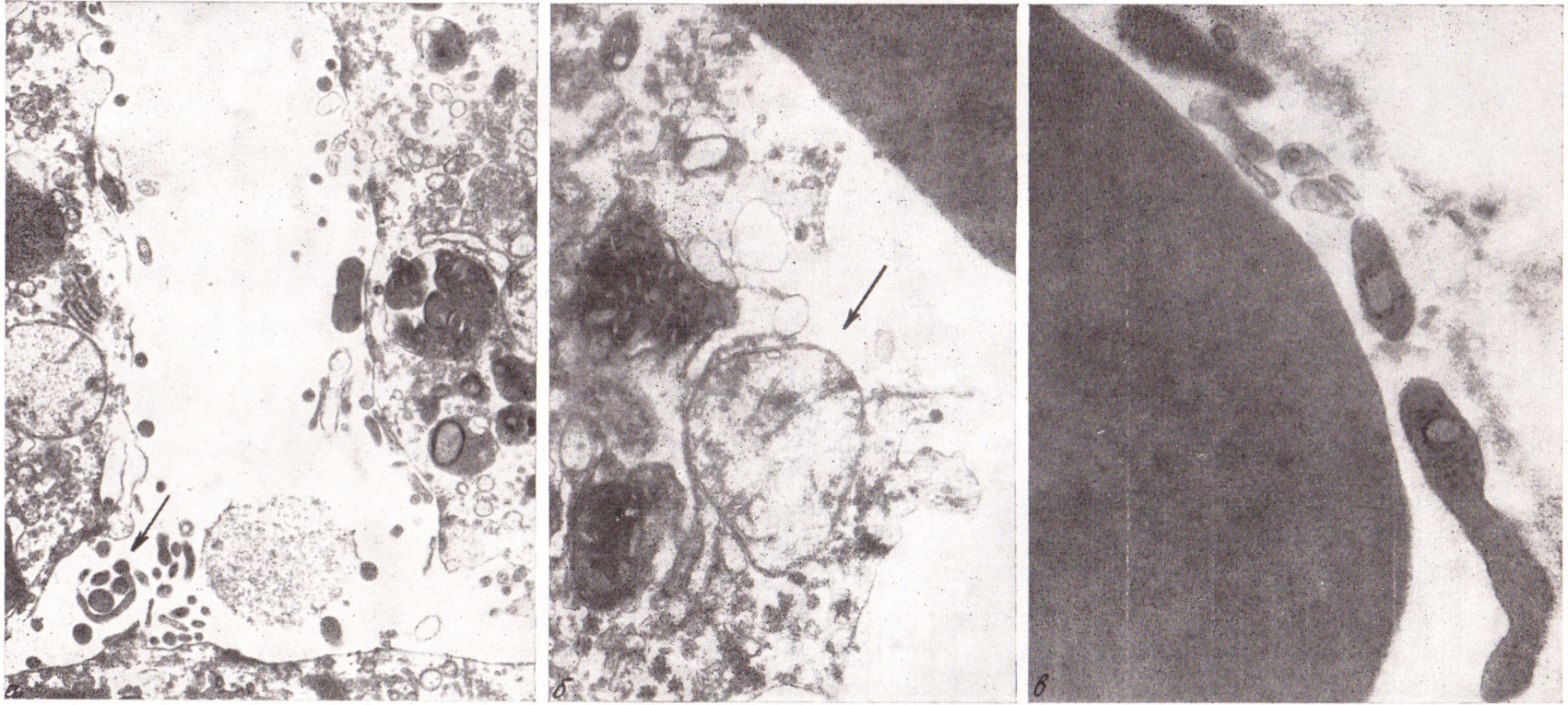


Рис. 1. Дезорганизация мембранных структур печени крысы при нарушении ее иннервации. *а* — разобщение гепатоцитов и разрушение капилляра (стрелка); уплотнение и набухание митохондрий, 14 000 \times ; *б* — фрагмент гепатоцита с нарушенной целостностью плазмалеммы (стрелка), 19 000 \times ; *в* — разобщение межэндотелиальных контактов в капилляре, 67 200 \times

вергавшейся обработке БЭ, составляла 10^6 – 10^7 кл/мл, концентрация БЭ от 0,5 мкг/мл до 20 мкг/мл.

При добавлении к водной суспензии дрожжевых организмов БЭ (концентрация 5 мкг/мл) через 30 мин. при наблюдении в флуоресцентном микроскопе обнаруживается отчетливое свечение БЭ в виде зернистых, палочковидных и нитевидных структур, аналогичных тем, которые возникают при витальном окрашивании митохондрий янусом зеленым или при флуорохромировании ауорофосфаном (рис. 1 а, б, в).

Таблица 1

Скорость размножения дрожжевых организмов при добавлении к питательной среде БЭ в различных количествах (% к контролю)

Культура дрожжевых организмов	Контрольные не-обработанные	Концентрация БЭ, мкг/мл				
		0,5	1	2,5	5	30
<i>Endomyces magnusii</i>	100	92,3	90,4	—	80,7	48,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	95,6	91,3	86,9	86,9	71,0

Комплекс БЭ с митохондриями довольно устойчив и свечение его сохраняется в течение длительного времени, пока клетки не теряют своей жизнеспособности. При отмирании клеток и при увеличении концентрации БЭ (что также приводит к гибели клеток) появляется свечение комплекса нуклеиновых кислот с БЭ в ядре и диффузное — в цитоплазме. Избирательная флуоресценция митохондрий при этом исчезает. Отмечается различие в количестве светящегося комплекса в митохондриях клеток, выращенных при различной степени аэрации. Недостаточная аэрация (высокий слой жидкого суслу) приводит к заметному снижению количества светящегося комплекса БЭ с митохондриями.

Как известно, при снижении степени аэрации дрожжевые организмы способные к анаэробному метаболизму, переключаются на бродильный обмен. В этом случае происходит удлинение митохондрий, редукция крист, изменение содержания митДНК. Эти изменения отражаются на комплекссообразовании БЭ с митохондриальными нуклеиновыми кислотами. После культивирования дрожжевых организмов на питательной среде, к которой добавлен БЭ, светящийся комплекс в митохондриях выявляется только при низких концентрациях БЭ (ниже 0,5 мкг/мл). При более высоких концентрациях светятся только ядро и диффузно цитоплазма, свечения митохондрий наблюдать не удается и при последующей дополнительной обработке клеток растворами БЭ.

Согласно литературным данным, в процессе развития дрожжевых клеток на питательной среде с добавлением БЭ происходит частичная или почти полная деградация митДНК. Проникновение БЭ в митохондрии и образование комплексов его с митДНК живых дрожжевых организмов должно в той или иной степени отражаться на физиологии размножения этих организмов. Проведенное нами определение влияния БЭ на скорость размножения дрожжевых клеток (по оптической плотности суспензии на фотоэлектрическом нефелометре) показало результаты, представленные в табл. 1. БЭ в концентрации 5 мкг/мл, т. е. концентрации, при которой наблюдается избирательное комплекссообразование в митохондриях, угнетает размножение дрожжевых клеток в среднем на 15–20%. Таким образом, реакция взаимодействия БЭ с митДНК дрожжевых клеток практически происходит без значительного угнетения жизнедеятельности клеток.

Заслуживает внимания тот факт, что у дрожжей *Rhodotorula glutinis*, являющихся облигатными аэробами, неспособными к брожению, не удается наблюдать связывания БЭ с митохондриями. При малых концентрациях БЭ митохондрии не флуоресцируют, а при значительных — начинают светиться ядро. В клетках бактерий, обработанных БЭ (концентрация 0,5—1 мкг/мл), ярко светящийся комплекс БЭ с НК выявляется избирательно в нуклеоидах клеток (рис. 1 г). При использовании более высоких концентраций БЭ начинает светиться вся цитоплазма клетки, что сопровождается необратимым повреждением бактерий.

Проведенные нами исследования локализации комплекса БЭ с НК непосредственно в интактных клетках микроорганизмов показали, что при низких концентрациях БЭ накапливается в митохондриях дрожжевых клеток и в нуклеоидах бактериальных клеток. При использовании более высоких концентраций БЭ отмечается связывание БЭ с ДНК ядер и РНК цитоплазмы.

Итак, нашими исследованиями обнаружено, что БЭ в одних и тех же условиях, проникая в живые микробные клетки, связывается, будучи в малых концентрациях, у дрожжей с ДНК митохондрий, а у бактерий с ДНК нуклеоидов. При необратимом повреждении клеток высокими концентрациями БЭ избирательное выявление митохондрий у дрожжей и нуклеоидов у бактерий прекращается; возникает свечение ядер у дрожжей и менее выраженное диффузное свечение цитоплазмы. У бактерий в этих условиях флуоресцирует вся клетка. У представителей дрожжевых организмов, принадлежащих к факультативным анаэробам, т. е. способных размножаться как в аэробных, так и в относительно анаэробных условиях (брожение), БЭ при падающих концентрациях связывается только с ДНК митохондрий, у дрожжей — облигатных аэробов сколько-нибудь значительного связывания БЭ с ДНК митохондрий не наблюдается. В клетках животных организмов (в клетках культуры тканей) не удается получить прижизненного связывания БЭ с митохондриями. Прижизненное связывание БЭ с митохондриями дрожжей, способных к дыханию и брожению, приводит к незначительному снижению скорости их размножения. Прижизненное связывание БЭ с нуклеоидами бактерий снижает скорость их размножения на 40—50%. Борст и Кроон⁽¹¹⁾ высказали предположение, что предпочтительное взаимодействие некоторых акридиновых красителей с митДНК дрожжевых организмов может быть связано с тем, что ядерная ДНК у эукариотных организмов защищена гистонами или двухвалентными катионами, а также отличается от митохондриальной структурной организацией. Вполне возможно отнести это объяснение к обнаруженному нами различию в чувствительности к БЭ ДНК митохондрий дрожжей и нуклеоидов бактерий, с одной стороны, и ядер дрожжей — с другой.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. B. Y. Le Pecq, C. Paoletti, C. R., v. 259, 1786 (1964). ² J. E. Gill, Biophys. Soc. Program and Abstr. 15th Ann. Meet. New Orleans, N. Y., v. 4, 1971, p. 210. ³ A. T. Карапетян, В. И. Пермогоров и др., Молек. биол., т. 6, 867 (1972). ⁴ P. P. Slonimski, G. Perrodin, J. H. Croft, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 30, 232 (1968). ⁵ Ph. S. Perlman, H. R. Mahler, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 44, 261 (1971). ⁶ R. Schwab, M. Sebal, F. Kaudewitz, Mol. and Gen. Genet., v. 110, 361 (1971). ⁷ E. S. Goldring, L. I. Grossmann et al., J. Mol. Biol., v. 52, 323 (1970). ⁸ P. Borst, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 333 (1972). ⁹ M. McGill, T. C. Hsu, B. R. Brinkley, J. Cell. Biol., v. 59, 260 (1973). ¹⁰ V. W. F. Burns, Exp. Cell. Res., v. 75, 200 (1972). ¹¹ P. Borst, A. M. Kroon, Intern. Rev. Cytol., v. 26, N. Y.—London, 1969, p. 107.