

В. П. СОЙФЕР, Н. И. ЯКОВЛЕВА

### ИНГИБИРОВАНИЕ СИНТЕЗА ДНК В БАКТЕРИЯХ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ 1 М ГИДРОКСИЛАМИНОМ

(Представлено академиком А. А. Бавевым 24 IV 1974)

В экспериментах с бактериофагом лямбда, обработывавшимся внеклеточно раствором 1 М гидроксилamina и затем пассированным в клетках с нормальными ферментами темновой репарации и в клетках, дефектных по у.-ф.-специфической эндонуклеазе, было установлено (<sup>1-3</sup>), что повреждения ДНК, вызванные такой обработкой, не репарируются. Представляло интерес выяснить, изменяется ли скорость и кинетика процесса репликации ДНК, подвергнутой обработке гидроксилaminом. Для этой работы предпочтительнее была модель неинфицированных фагом клеток. В эксперимент были взяты бактерии *E. coli* K12 *uvr*<sup>+</sup> *thy*<sup>-</sup> (AB 2497 по каталогу П. Говарда — Фландерса) и *E. coli* K12 *uvr* A6 *thy*<sup>-</sup> (AB 2500), любезно присланные нам проф. К. Смитом (США). Популяцию бактерий, выращенных в питательном бульоне (пептон («Spofa») 10 г; NH<sub>4</sub>Cl 1 г; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 г; NaCl 8 г; цитрат Na 2 г; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,27 г; дрожжевой экстракт («Difco») 1 г; казеиновый гидролизат («Calbiochem») 0,5 г; глюкоза (40%) 12,5 мл, pH 6,8—7,0), осаждали центрифугированием и ресуспендировали в минимальной среде (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 · 10<sup>-2</sup> М, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 · 10<sup>-2</sup> М, MgSO<sub>4</sub> 4,1 · 10<sup>-4</sup> М; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,6 · 10<sup>-3</sup> М; лимоннокислый Na 1,4 · 10<sup>-3</sup> М; CaCl<sub>2</sub> 3,4 · 10<sup>-5</sup> М, FeSO<sub>4</sub> 9,0 · 10<sup>-7</sup> М; глюкоза 0,4%), обогащенной тимидином (10 мкг/мл). После часовой синхронизации репликации ДНК при 25° («Colora Vox», Швеция) клетки переносили в раствор 1 М гидроксилamina («Koch Light», Англия) в 1 М NaCl

(pH 7,0) и инкубировали их при температуре 25° в течение 1 часа. По окончании инкубирования бактерии дважды отмывали в свежей минеральной среде без тимидина и затем переносили в среду для роста (среда M-9 с добавкой 0,25% раствора казаминовых кислот («Difco vitamin free casamino acid»), 10<sup>-5</sup>% тиамина и 10 мкг/мл тимиана (оба «Colbiochem»),

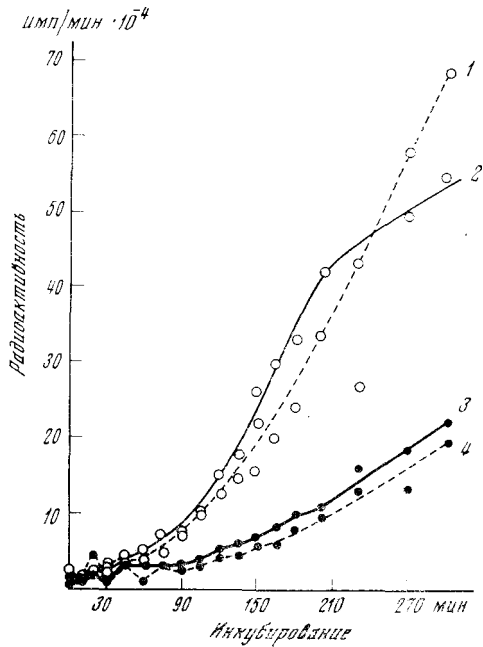


Рис. 1. Кинетика синтеза ДНК в бактериях *E. coli* K12 *uvr*<sup>+</sup> (AB 2497) и *E. coli* K12 *uvr* A6 (AB 2500), предварительно обработанных раствором 1 М гидроксилamina и затем инкубированных в ростовой среде. 1, 2 — клетки в 1 М NaCl, 3, 4 — клетки в 1 М гидроксилamine, растворенном в 1 М NaCl. Сплошная линия — AB 2497, штриховая — AB 2500

и инкубировали их при температуре 25° в течение 1 часа. По окончании инкубирования бактерии дважды отмывали в свежей минеральной среде без тимидина и затем переносили в среду для роста (среда M-9 с добавкой 0,25% раствора казаминовых кислот («Difco vitamin free casamino acid»), 10<sup>-5</sup>% тиамина и 10 мкг/мл тимиана (оба «Colbiochem»),

предварительно подогретую до 37°, в которую вносили одновременно с бактериями 10 мкС/мл Н<sup>3</sup>-тимидина (удельная активность 0,45 С/ммол). Пробы бактериальной суспензии (по 0,5 мл) переносили в охлажденную до 4° трихлоруксусную кислоту («Хепон», Польша, конечная концентрация 10%) и после 1-часового выдерживания в ледяной бане содержимое пробирок переносили на нитроцеллюлозные фильтры Синпор, Ауфе (ЧССР), промывали осадок 5 мл 5% ТХУ и 2 мл этанола. Фильтры после

высушивания помещали во флаконы сцинтилляционного счетчика, заливали 10 мл толуолового сцинтиллятора (РРО 4 г, РОРОР 0,1 г, толуол до 1 л) и измеряли радиоактивность в радиоспектрометре Mark II фирмы «Nuclear Chicago» (США). Для определения кинетики скорости синтеза ДНК использовали примерно одинаковое количество жизнеспособных бактерий. Пробы на выживаемость брали примерно через 15-минутные интервалы.

Учитывая данные, полученные при изучении динамики размножения бактерий в жидких питательных средах, использовавшихся нами, и показавшие, что цикл репликации ДНК составляет в этих условиях около 1 часа, время синхронизации репликации было выбрано равным 60 мин. За это время уже начавшийся раунд репликации доводился ДНК-полимеразами до конца, но новый раунд в отсутствие аминокислот в среде не начинался. После переноса в богатую питательную среду (среду для роста) синтез ДНК возобновлялся.

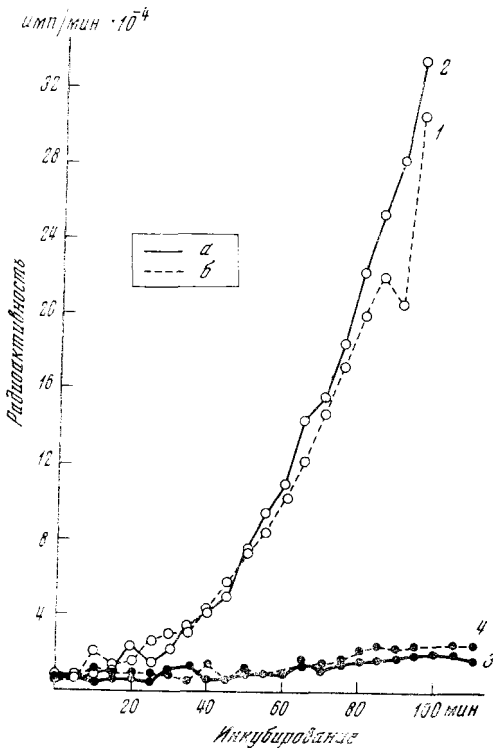


Рис. 2. Кинетика синтеза ДНК в бактериях, инкубированных после обработки гидроксил-амином в течение 5 час. Обозначения те же, что и на рис. 1; а — АВ 2497, б — АВ 2500

Было проведено две серии экспериментов по изучению ингибирования репликации ДНК 1 М гидроксил-амином. В первой серии опытов анализ включения Н<sup>3</sup>-тимидина в кислотонерастворимый материал проводили через каждые 5 мин. на протяжении 3 час. после отмытки бактерий от гидроксил-амина. На рис. 1 представлены результаты, полученные в этой серии экспериментов. Обработка гидроксил-амином привела к резкому блокированию синтеза ДНК. К 120-й мин. уровень включения Н<sup>3</sup>-тимидина возрос в обработанных клетках только в 4—6 раз (4489 имп/мин в нулевую минуту после отмытки и 17662 имп/мин на 120-й мин. для клеток, нормальных по системе ферментов темновой репарации, и 4187 и 26263 имп/мин соответственно для линий бактерий, дефектных по эндонуклеазе). В клетках обеих линий, не обрабатывавшихся гидроксил-амином, уровень включения метки возрос в 50—60 раз. Данные об уровне синтеза ДНК хорошо коррелировали с данными по увеличению числа клеток. Таким образом, никакой разницы в поведении клеток АВ 2497 и АВ 2500 после обработки гидроксил-амином отмечено не было: кривые, характеризующие синтез ДНК в клетках обоих штаммов, совпали. Эти эксперименты показали, что хотя синтез ДНК в поврежденных гидроксил-

амином клетках наблюдается (отмечено увеличение включения  $H^3$ -тимидина в 4—6 раз), но до 120-й мин. инкубирования не происходит большого восстановления синтеза ДНК. В то же время представляло интерес исследовать продолжительность задержки синтеза ДНК, с одной стороны, и уровень восстановления синтеза в клетках, с другой стороны.

Для этого была проведена вторая серия опытов, в которых синтез ДНК анализировали в течение 5 час. после обработки гидроксиламином. Так же, как и в первой серии экспериментов, до 100—120-й мин. после отмывки клеток от гидроксилламина наблюдалось лишь незначительное увеличение синтеза ДНК в клетках, обработанных 1 *M* гидроксиламином (рис. 2). Если в первые 10 мин. счет радиоактивности в кислотонерастворимой фракции клеток АВ 2497 и АВ 2500 составил 10 286 и 5679 имп/мин, то на 105—120-й мин. инкубирования были получены значения 47 850 и 34 953 имп/мин соответственно (синтез ДНК увеличился в 4,7—6,1 раза). Но в дальнейшем, по прохождении следующих актов деления клеток, уровень синтеза ДНК заметно возрос. К пятому часу инкубации уровень включения возрос для линии АВ 2497 в 27 раз (275 тыс. имп/мин), а для линии АВ 2500 — в 35 раз (198 тыс. имп/мин). В контрольных вариантах уровень включения метки к этому времени увеличился в 50—60 раз. Таким образом, восстановление синтеза ДНК наблюдалось после третьего часа инкубирования гидроксиламином. Степень ингибирования синтеза ДНК оказалась одинаковой для обеих исследованных линий бактерий.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что из-за отсутствия репарационного восстановления повреждений, вызванных обработкой 1 *M* гидроксиламином, ДНК-полимеразы не могут вести репликацию ДНК столь же эффективно, как в контрольных клетках. Это ингибирование ферментной активности ДНК-полимера происходит одинаково в обоих штаммах бактерий. Тем самым эти данные согласуются с предположением о том, что у.-ф.-специфичная эндонуклеаза не узнает повреждений, индуцированных в ДНК 1 *M* гидроксиламином в средах высокого осмотического давления, и в силу этого не запускает реакцию репарации этих повреждений. Повреждения, оставшиеся в ДНК обоих штаммов количественно в одинаковом числе, ингибируют работу ДНК-полимеров в равной мере.

Лаборатория молекулярной биологии и генетики  
Всесоюзной Академии сельскохозяйственных наук  
им. В. И. Ленина  
Москва

Поступило  
23 IV 1974

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> V. N. Soyfer, *Microbial Genetics Bull.*, v. 31, 18 (1969). <sup>2</sup> V. N. Soyfer, *Arch. Roumain Pathol. exp. et Microbiol.*, т. 28, 941 (1969). <sup>3</sup> В. Н. Соуфер, *Вопросы вирусологии*, № 6, 667 (1970).