

Ю. Ю. ГЛЕБА, М. М. ХАСАНОВ, А. Г. СМОУСАРЕНКО,  
Р. Г. БУТЕНКО, Ю. П. ВИНЕЦКИЙ

**ПРОНИКНОВЕНИЕ  $^3\text{H}$ -ДНК *BACILLUS SUBTILIS*  
В ИЗОЛИРОВАННЫЕ ПРОТОПЛАСТЫ КЛЕТОК ТАБАКА  
*NICOTIANA TABACUM L.***

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 28 III 1974)

В работах (<sup>1-3</sup>) обнаружено проникновение ДНК в изолированные протопласты высших растений. Можно полагать, что в случае включения чужеродной ДНК в геном растительной клетки способность протопластов к регенерации клеточной оболочки, делению и органогенезу позволит получить целое растение с новыми генетическими признаками. В данной работе изучалось проникновение  $^3\text{H}$ -ДНК *B. subtilis* в изолированные протопласты клеток мезофилла листьев табака — *Nicotiana tabacum L.*, сорт *Trapesond*, и влияние на этот процесс некоторых соединений и антибиотиков с различным механизмом действия.

Изолированные протопласты клеток мезофилла табака получали по модифицированному методу Такебе и соавт. (<sup>4</sup>), применяя целлюлазу Онозука Р-1500 и мацерозим Р-10 (фирмы «Kinki Yakult Biochemical Co., Ltd», Япония). В опытах использовали суспензии  $1-3,5 \cdot 10^6$  протопластов на 1 мл; фракция разрушенных протопластов составляла около 10%. Бактерии *B. subtilis*  $\text{thy}^-$  выращивали в среде Спицайзена (<sup>5</sup>) с добавками 0,5 мг/мл казаминовых кислот «Дифко», 30 мкг/мл  $^3\text{H}$ -тимидина (11,6 С/ммоль) и 2 мг/мл тимидина. ДНК выделяли по методу Мармура (<sup>6</sup>), дополняя его обработкой проназой (2 мг/мл). Было использовано два препарата ДНК с удельными активностями 300 000 и 450 000 имп/(мкг·мин). Молекулярный вес ДНК в препаратах был равен  $5 \cdot 10^6$ . Его определяли путем центрифугирования в щелочном градиенте сахарозы с маркерной  $^{14}\text{C}$ -ДНК фага Т7 в роторе SW-65 центрифуги «Спинко» Л2—65Б при 38 000 об/мин и 20° в течение 3 час. Для опытов использовали протопласты, суспендированные в среде «В» Нагаты и Такебе (<sup>7</sup>), в которой, в отличие от основной ростовой среды, не содержится фитогормонов и концентрация маннитола составляла 0,4 М вместо 0,7 М. К 0,4—0,8 мл суспензии протопластов в этой среде добавляли 0,05—0,1 мл раствора ДНК (40 мкг/мл в 0,15 М NaCl+0,015 М  $\text{Na}_2$ -цитрат) и 0,05—0,1 мл растворов испытуемых соединений. Концентрация ДНК во всех опытах составляла 4 мкг/мл. Инкубацию протопластов с ДНК проводили при 26°. После инкубации протопласты осаждали при 1000 об/мин в центрифуге К-23 (ГДР) и ресуспендировали в равном объеме среды «В». Для гидролиза экзогенной ДНК пробы обрабатывали ДНКазой (100 мкг/мл, Ленинградский мясокомбинат им. Кирова) 5 мин. при 37° в присутствии 0,003 М  $\text{MgCl}_2$ . Затем протопласты отмывали от продуктов гидролиза путем четырехкратного осаждения в центрифуге, ресуспендировали в 10 мл среды «В» и лизировали 1% додецилсульфатом натрия при 60° в течение 30 мин.

Для того чтобы оценить степень деградации бактериальной ДНК в протопластах, определяли фракцию  $^3\text{H}$ -ДНК, осаждаемую кислотой. Каждую пробу разделяли пополам, одну часть 15 мин. нагревали в кипящей водяной бане с равным объемом 12%  $\text{HClO}_4$ , к другой части добавляли на холоду десятикратный объем 6%  $\text{HClO}_4$ , выдерживали 15 мин., центрифуге-

гировали, к осадку добавляли начальный объем 6%  $\text{HClO}_4$  и гидролизовали. Для обесцвечивания гидролизатов добавляли 2 капли 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Счет радиоактивности проводили в системе гамма 10-X — толуол в сцинтилято-ре (8 г ППО+0,05 г ПОПОП на 1 л толуола). Во всех опытах ставили две параллельные независимые пробы. Количество поглощенной ДНК выражали в процентах от всей радиоактивности в пробе с поправкой на гашение.

При проведении опытов мы учитывали, что проникновение ДНК в протопласты клеток растений имеет по своему характеру аналогию с поглощением ДНК протопластами и сферопластами бактерий. Известно, что исход трансформации и трансфекции зависит от компетентности прото-пластов, выраженность которой изменяется от опыта к опыту. Поэтому в каждом эксперименте во всех вариантах опытов использовали прото-пласты одной партии.

Таблица 1

Проникновение  $^3\text{H}$ -ДНК *B. subtilis* в протопласты клеток табака в зависимости от времени инкубации

Время инкубации, час.	Протопласт, мл							
	$2,8 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
0	<u>0,28</u>	<u>0,38</u>	<u>0,33</u>		<u>0,05</u>		<u>0,26</u>	<u>0,5</u>
	0,04	0,32	0,15		0,02		0,1	0,2
1,5	<u>0,94</u>	<u>1,14</u>	<u>1,43</u>				<u>0,19</u>	
	0,31	0,57	0,25				0,05	
3	<u>1,05</u>	<u>2,82</u>	<u>2,91</u>				<u>0,21</u>	
	0,1	0,55	0,35				0,18	
4,5	<u>1,32</u>	<u>1,83</u>	<u>3,97</u>	<u>1,69</u>	<u>1,14</u>	<u>1,06</u>	<u>0,46</u>	<u>2,15</u>
	0,09	0,69	0,25	0,34	0,13	0,04	0,05	0,2
6	<u>1,51</u>	<u>2,34</u>	<u>3,46</u>				<u>0,52</u>	<u>1,11</u>
	0,09	0,6	0,2				0,05	—

Примечание. Числа над чертой — общее включение, числа под чертой — кислотоосаждаемая фракция.

В табл. 1 приведены результаты опытов, в которых определяли количество проникшей ДНК в протопласты табака за разное время инкубации. Проникновение ДНК в различных опытах было неодинаковым. За 4,5 часа инкубации максимальная величина составляла 3,97%, минимальная за это же время 0,46%. Количество ДНК в кислотоосаждаемой фракции во всех опытах было много меньше, чем во фракции общего включения. Из этих результатов следует, что ДНК в протопластах подвергается интенсивной деградации. Для того чтобы выяснить, на каком этапе происходит деградация ДНК — внутри протопластов или до ее проникновения, т. е. в культуральной среде, определяли ДНКазную активность протопластов. Протопласты инкубировали без ДНК, лизировали добавлением равного объема воды, добавляли  $^3\text{H}$ -ДНК, инкубировали 5 мин. при  $37^\circ$ , затем добавляли ТХУ и альбумин как носитель и осаждали в центрифуге. Метку определяли в надосадочной жидкости. Ниже приведены результаты.

Время инкубации, час.	0	1,0	2,0	3,0	4,5
Гидролизованная ДНК, от общего количества (0,02%)	0,75	0,5	0,48	0,68	0,63

Из этого опыта следует, что в самих протопластах ДНКазная активность имеет малую выраженность и не изменяется во времени инкубации. Видимо, процесс деградации ДНК осуществляется нуклеазами разрушен-

ных протопластов в культуральной жидкости. Низкий уровень ДНКазной активности в протопластах клеток сои отмечен в (8).

В следующей серии опытов исследовали проникновение ДНК при добавлении различных соединений: поликатионов (поли-*l*-лизина, поли-*l*-орнитина), ДЭАЭ-декстранов и декстранов разной полимерности, фикола, полиэтиленгликолей разной полимерности и протаминсульфата. Результаты приведены в табл. 2. Видно, что максимальный эффект на про-

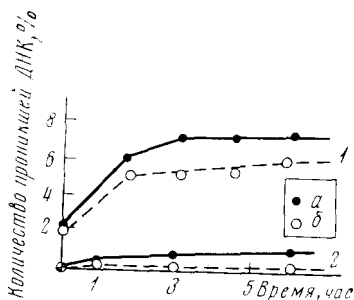


Рис. 1

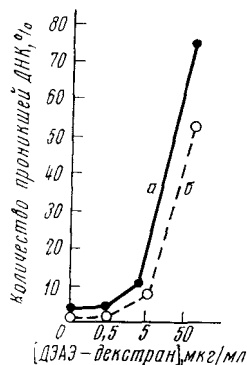


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость проникновения <sup>3</sup>H-ДНК *B. subtilis* в изолированные протопласты клеток табака с ДЭАЭ-декстраном (1) и без него (2), концентрация ДЭАЭ-декстрана 5 мкг/мл. а — общее включение, б — кислотоосаждаемая фракция

Рис. 2. Влияние концентрации ДЭАЭ-декстрана на проникновение <sup>3</sup>H-ДНК *B. subtilis* в изолированные протопласты клеток табака. а, б — то же, что на рис. 1

никновение ДНК оказывает ДЭАЭ-декстран с молекулярным весом  $5 \cdot 10^5$ , далее, по уменьшению эффекта — ДЭАЭ-декстран с молекулярным весом  $2 \cdot 10^6$ , поли-*l*-орнитин, поли-*l*-лизин, протаминсульфат. Декстраны, фикола и полиэтиленгликоли не оказывали стимулирующего эффекта. Эффект добавления ДЭАЭ-декстрана проявлялся при концентрации последнего

Таблица 2

Влияние разных соединений на проникновение <sup>3</sup>H-ДНК *B. subtilis* в протопласты клеток табака (время инкубации во всех опытах 4,5 часа)

Добавка	Молекулярный вес добавок	Количество до- бавок, мкг/мл	Количество проникшей ДНК, % от экзогенной метки		Добавка	Молекулярный вес добавок	Количество до- бавок, мкг/мл	Количество проникшей ДНК, % от экзогенной метки	
			общее включение	кислотоосаждаемая фракция				общее включение	кислотоосаждаемая фракция
Без добавок	—	—	0,18	0,04	Фикола	$4 \cdot 10^5$	5	0,06	0,04
ДЭАЭ-декстран	$5 \cdot 10^5$	5	9,84	7,56	Полиэтилен- гликоль	$2 \cdot 10^3$	100	0,1	0,03
		100	25,4	17,48			5	0,12	0,03
		100	14,86	5,66			100	0,1	0,03
Декстран-суль- фат	$5 \cdot 10^5$	5	0,08	0,08	Протамин- сульфат	400	5	0,1	0,03
		100	0,1	0,03			50	0,12	0,04
Декстран	$4 \cdot 10^4$	5	0,1	0,03	Поли- <i>l</i> -орни- тин	100	5	6,82	4,63
Декстран	$1 \cdot 10^5$	100	0,12	0,03			Поли- <i>l</i> -лизин	5	1,86
		5	0,1	0,04					
		100	0,08	0,04					

5 мкг/мл и 70-кратного превышения над контролем достигал при концентрации 50 мкг/мл.

Действие ДЭАЭ-декстрана и поликатионов, по-видимому, связано с защитой ДНК от деградации. Это соображение основано на сравнении количества меченой ДНК во фракциях общего включения и кислотоосажденной фракции. В последней фракции количество ДНК в протопластах при добавлении стимуляторов резко возрастало. На рис. 1 приведены кривые зависимости проникновения ДНК в протопласты от времени инкубации при добавлении ДЭАЭ-декстрана и без него.

Для того чтобы сделать попытку понять механизм проникновения ДНК бактерии в протопласты клеток табака, мы изучили влияние антибиотиков с различными механизмами действия (стрептомицин, циклогексимид, рифамицин, хлорамфеникол), 5-ФУДР и цианистого калия в системе ДНК — протопласты. Как в опытах с добавкой ДЭАЭ-декстрана, так и без него заметного влияния не было обнаружено.

Исследовали влияние различных концентраций ДНК и ДЭАЭ-декстрана на жизнеспособность изолированных протопластов. Обнаружено, что добавление ДНК в концентрациях выше 4 мкг/мл и ДЭАЭ-декстрана выше 5 мкг/мл приводит к разрушению протопластов. При более низких концентрациях ДНК и ДЭАЭ-декстрана протопласты регенерировали клеточную оболочку и делились.

Полученные результаты дают нам возможность сделать вывод, что бактериальная ДНК проникает в протопласты клеток табака, подвергаясь при этом деградации. Эта деградация может быть уменьшена при добавлении ДЭАЭ-декстрана, поликатионов или же протаминсульфата. В работе были выяснены параметры процесса проникновения ДНК, что дает возможность начать проведение экспериментов по включению бактериальных генов в геном растительной клетки.

Институт физиологии растений  
Академии наук СССР

Поступило  
28 III 1974

Институт общей генетики  
Академии наук СССР  
Москва

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> K. Ohyama, O. L. Gamborg, R. A. Miller, *Canad. J. Bot.*, v. 50, 2077 (1972).  
<sup>2</sup> K. Ohyama, O. L. Gamborg et al., *Coll. Int. C. N. R. S.*, v. 212, 423, Paris (1973).  
<sup>3</sup> F. Hoffman, *Zs. Pflanzenphysiol.*, B. 69, 249 (1973). <sup>4</sup> J. Takebe, Y. Otsuki, S. Aoki, *Plant Cell Physiol.*, v. 9, 115 (1968). <sup>5</sup> J. Spizizen, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* v. 44, 1072 (1968). <sup>6</sup> J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, v. 3, 208 (1961). <sup>7</sup> T. Nagata, J. Takebe, *Planta*, v. 99, 12 (1971). <sup>8</sup> F. B. Holl, *Coll. Int. C. N. R. S.*, v. 212, 509, Paris (1973).