



УДК 577.113+123.5

Ю. М. Константинов, В. А. Подсеоный, Г. Н. Луценко, М. И. Ривкин

## СИНТЕЗ ДНК В ИНТАКТНЫХ МИТОХОНДРИЯХ КУКУРУЗЫ, ОБРАБОТАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ВЕКТОРНЫМИ ПЛАЗМИДАМИ СЕРИИ pBR

*Установлена возможность транслокации бактериальных векторных плазмид pBR327 и pBR322 во внутреннее пространство изолированных митохондрий проростков кукурузы. С использованием радиоавтографического анализа обнаружена матричная активность плазмиды pBR322 в отношении синтеза ДНК в генетической системе интактных митохондрий кукурузы.*

**Введение.** В составе митохондриального генома ряда высших растений наряду с высокомолекулярной кольцевой ДНК обнаружены видоспецифичные наборы кольцевых и линейных молекул ДНК с размерами от 1000 до 11000 пар нуклеотидов (п. н.) — плазмидоподобные ДНК (пнДНК) [1, 2].

Первоначально наличие в митохондриях пнДНК считалось характерным для некоторых высших растений с признаком цитоплазматической мужской стерильности [3, 4]. Позднее было показано, что такой вид ДНК присутствует и в митохондриях с нормальным типом цитоплазмы [1].

Проведенные в последние годы исследования синтеза митохондриальных ДНК (мтДНК) разной величины в изолированных митохондриях кукурузы [5, 6] свидетельствуют в пользу наличия у пнДНК свойств автономного репликона. С учетом существования определенного структурного сходства между пнДНК и плазмидами микроорганизмов значительный теоретический интерес представляет изучение вопроса о возможности транслокации бактериальных плазмид внутрь растительных митохондрий и использовании их в качестве матриц для синтеза ДНК. Такие исследования важны также с практической точки зрения, так как дают возможность применять интактные митохондрии и мтДНК в экспериментах по генетической и клеточной инженерии [7—9]. В связи с этим целью настоящей работы было исследование вероятности транслокации и синтеза ДНК бактериальных векторных плазмид pBR322 и pBR327 в системе интактных митохондрий кукурузы.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали митохондрии, выделенные из трехдневных этиолированных проростков кукурузы гибрида «Краснодарский 303 ТВ» по методу [10]. Конечный осадок митохондрий ресуспендировали в растворе, содержащем 68 мМ сахарозу, 20 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4 мМ KCl, 20 мМ сукцинат натрия, 0,5 мМ АТР, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 мМ трис-HCl, pH 7,4. Повышенная по сравнению с обычно используемой концентрация  $\text{MgCl}_2$  в среде инкубации создавалась для индукции образования комплекса ДНК— $\text{Mg}^{2+}$ —мембрана. Образование комплексов нуклеиновых кислот с мембранами в присутствии двухвалентных катионов и возможные механизмы транслокации ДНК через искусственные фосфолипидные мембраны и мембраны митохондрий подробно рассматривались в работах [11, 12].

Для транслокации плазмидной ДНК внутрь митохондрий к суспензии органоелл (10 мг белка на 1 мл) добавляли 4—8 мкг ДНК плазмиды pBR322 или pBR327 и инкубировали смесь в течение 30 мин на водяной бане.

От не связавшейся с митохондриальными мембранами плазмидной ДНК освобождались, трехкратно переосаждая митохондрии центрифугированием. Для удаления сорбировавшейся на поверхности митохондриальных мембран плазмидной ДНК использовали обработку митохондрий панкреатической ДНКазой (100 мкг/мл) производства фирмы «Serva» (ФРГ).

В опытах по гибридизации электроперенос ДНК с агарозного геля на нитроцеллюлозную мембрану («Schleicher and Schull», ФРГ) проводили в ячейке «Trans-Blot cell» производства фирмы «Bio-Rad» (США) в трис-боратном буфере. Мембрану прегибридизовали при 65 °С 4 ч в стандартном растворе, а затем при той же температуре гибридизовали 16 ч с ДНК плазмиды *pBR327*, меченой [<sup>32</sup>P]dGTP с помощью реакции ник-трансляции. Нитроцеллюлозную мембрану отмывали и сушили, как описано у Маннатса [13] и экспонировали с рентгеновской пленкой несколько часов.

Реакцию синтеза ДНК в митохондриях проводили по методу Сеггетта и Борста [14] с использованием [<sup>32</sup>P]dATP (удельная радиоактивность 111 ПБк/моль). Не включившийся в материал митохондрий [<sup>32</sup>P]NTP удаляли центрифугированием.

Для выделения и частичной очистки ДНК из митохондрий использовали метод [15] с незначительными модификациями. Очистку ДНК плазмид *pBR322* и *pBR327* проводили методом щелочной экстракции [16] с последующей гель-фильтрацией препарата на колонке с сепарозой CL-4B («Pharmacia», Швеция).

Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим способом с помощью электрода Кларка.

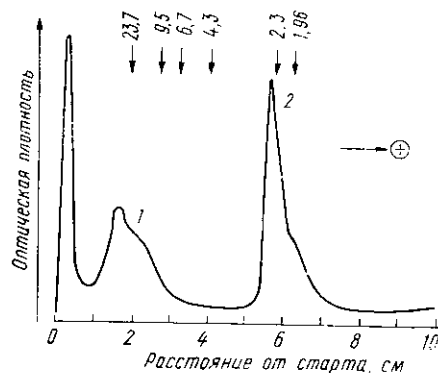
Концентрацию белка во фракции митохондрий определяли по методу Лоури [17].

Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в 0,8 %-ном агарозном геле. Для получения радиоавтографа гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 в течение нескольких суток. Денситометрирование результатов радиоавтографии осуществляли на микроденситометре МД-100 («Carl Zeiss», ГДР).

**Результаты и обсуждение.** Во всех экспериментах по изучению синтеза ДНК в органеллах и транслокации ДНК бактериальных плазмид внутрь органелл нами были использованы препараты свежевыделенных

Рис. 1. Денситограмма радиоавтографа ДНК митохондрий кукурузы: 1 — фракция высокомолекулярной ДНК; 2 — фракция плазмидоподобной ДНК. Стрелкой указано направление электрофореза. Цифры вверху обозначают положение соответствующих *HindIII*-фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , используемых в качестве маркеров

Fig. 1. Densitogram of maize mitochondria DNA radioautograph; 1 — the fraction of high-molecular DNA; 2 — the fraction of plasmid-like DNA. The arrow indicates the direction of electrophoresis. The numbers above show the position of corresponding *HindIII*-fragments of DNA of  $\lambda$  phage used as markers



митохондрий, имеющие в среднем дыхательный контроль 3,0 при окислении сукцината. Большая величина дыхательного контроля в совокупности с результатами проведенного в отдельных экспериментах электронно-микроскопического контроля интактности митохондрий (данные не приводятся) позволяют исключить факт влияния на регистрируемые процессы ферментов и кофакторов из разрушенных в ходе процедуры выделения митохондрий или субмитохондриальных частиц.

Анализ распределения радиоактивности во фракциях мтДНК после электрофореза в агарозном геле показал, что в условиях *in vitro* в интактных митохондриях синтез ДНК происходит со значительной скоростью как во фракции высокомолекулярной ДНК, так и во фракции ппДНК (рис. 1). При этом сопоставление величины отдельных пиков денситометрической кривой, полученной сканированием радиоавтографа препарата мтДНК, с интенсивностью флуоресценции соответствующих полос ДНК в геле при окраске бромистым этидием позволяет

заклучить, что интенсивность включения  $[^{32}\text{P}]\text{dATP}$  в ппДНК значительно выше, чем в высокомолекулярную ДНК. В специальных экспериментах было установлено, что скорость синтеза ппДНК различной величины, регистрируемая по включению  $[^3\text{H}]\text{dATP}$ , может превышать соответствующую величину для «хромосомной» ДНК митохондрий кукурузы в 10—50 раз. Таким образом, полученные данные подтвержда-

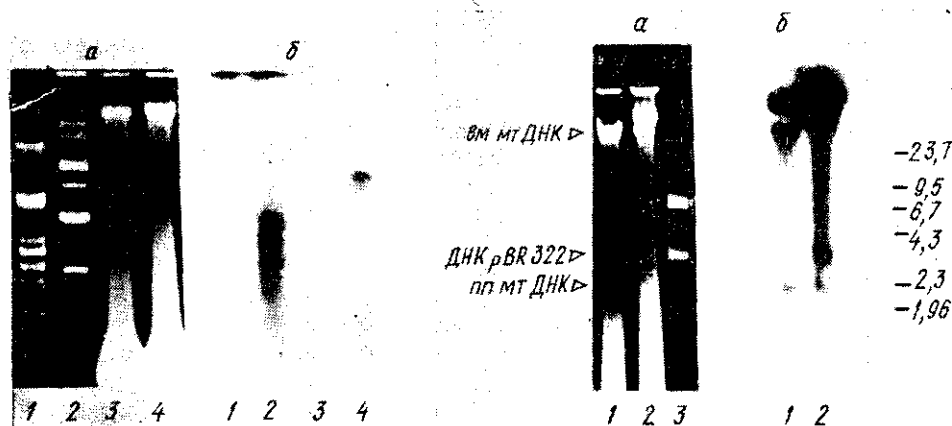


Рис. 2. Электрофоретический (а) и гибридационный (б) анализ ДНК митохондрий кукурузы, инкубированных с плазмидой *pBR327*: 1 — *Pst*I-фрагменты ДНК фага  $\lambda$ , используемые в качестве маркеров длины; 2 — ДНК плазмиды *pBR327*; 3 — ДНК контрольных митохондрий; 4 — ДНК митохондрий, инкубированных с плазмидой *pBR327*; б — радиоавтограф — результат гибридации блета а с плазмидой *pBR327*, меченной  $^{32}\text{P}$  в реакции ник-трансляции

Fig. 2. Electrophoretic (a) and hybridization (b) analysis of DNA in maize mitochondria incubated with *pBR327* plasmid: 1 — *Pst*I-fragments of  $\lambda$  phage DNA used as markers of the length; 2 — *pBR327* plasmid DNA; 3 — DNA of control mitochondria; 4 — DNA of mitochondria incubated with *pBR327* plasmid; б — radioautograph is due to a hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labelled *pBR327* plasmid in the nick-translation reaction

Рис. 3. Электрофоретический (а) и радиоавтографический (б) анализ ДНК контрольных и инкубированных с плазмидой *pBR322* митохондрий кукурузы: 1 — ДНК контрольных митохондрий; 2 — ДНК митохондрий, инкубированных с плазмидой; 3 — ДНК плазмиды *pBR322*. Справа указано положение *Hind*III-фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , используемых в качестве маркеров; Hm мтДНК, пп мтДНК — соответственно высокомолекулярная и плазмидоподобная митохондриальные ДНК

Fig. 3. Electrophoretic (a) and radioautographic (b) analysis of DNA of control *pBR322* plasmid-incubated maize mitochondria: 1 — DNA of control mitochondria; 2 — DNA of plasmid-incubated mitochondria; 3 — DNA of *pBR322* plasmid. The position of  $\lambda$  phage DNA *Hind*III-fragments used as markers is shown in the right. Hm mtDNA and pl mtDNA are high-molecular and plasmid-like mitochondrial DNAs, respectively

ют возможность существования независимого контроля синтеза ппДНК в митохондриях кукурузы.

Результаты электрофоретического анализа ДНК митохондрий, инкубированных с бактериальным плазмидным вектором *pBR327* с последующей обработкой ДНКазой, представлены на рис. 2, а. Можно видеть, что для митохондрий, инкубированных с плазмидой, характерно появление на электрофореграмме дополнительных полос, соответствующих по подвижности некоторым формам плазмидной ДНК. Обработка изолированных митохондрий панкреатической ДНКазой не приводила к исчезновению обнаруживаемых в опытном варианте полос ДНК. С помощью блот-гибридации было установлено, что препарат ДНК митохондрий, инкубированных с плазмидой, проявлял значительную чувствительность при использовании в качестве зонда  $^{32}\text{P}$ -меченной *pBR327* (рис. 2, б). При этом выявились две сильно различающиеся по степени связывания зонда полосы, соответствующие по электрофоретической подвижности ДНК *pBR327*. На радиоавтографе опытного варианта отмечено также наличие размытого пятна в нижней части геля, что, возможно, объясняется гибридацией зонда с продуктами деграда-

ции плазмидной ДНК, обусловленной действием митохондриальных нуклеаз. В целом изучение транспорта бактериальных плазмид в митохондриях проростков кукурузы показало, что способностью проникать во внутреннее пространство митохондрий обладают лишь отдельные физические формы плазмидной ДНК.

Результаты радиоавтографического изучения синтеза ДНК в митохондриях, инкубированных с ДНК бактериальной векторной плазмиды *pBR322*, представлены на рис. 3. При инкубации обработанных плазмидой митохондрий в условиях, благоприятствующих протеканию в них синтеза ДНК, было зарегистрировано появление нескольких фракций радиоактивно меченой ДНК. Электрофоретическая подвижность этих фракций соответствовала высокомолекулярной ДНК митохондрий, ковалентно замкнутой форме плазмиды *pBR322* и фракции пп мтДНК. Следовательно, при подобранных нами экспериментальных условиях происходила эффективная транслокация плазмидной ДНК во внутреннее пространство митохондрий, что делало ее доступной для мтДНК-полимеразы. Тот факт, что в митохондриальной системе обнаруживалась только ковалентно замкнутая форма бактериальной плазмиды, может, по-видимому, служить указанием на преимущественную транслокацию этой молекулярной формы плазмиды или предпочтительное по сравнению с остальными формами вовлечение ее в процесс митохондриального синтеза ДНК. Для заключений о характере зарегистрированного синтеза ДНК бактериальной плазмиды в митохондриях проростков кукурузы (репликативный или репаративный) требуются дополнительные исследования.

Итак, результаты проведенных экспериментов показывают, что ДНК бактериального плазмидного вектора *pBR322* обладает заметной матричной активностью в отношении синтеза ДНК *in vitro* в интактных митохондриях проростков кукурузы. Не исключено, что проявление матричных свойств бактериальной плазмиды в системе изолированных растительных митохондрий связано в определенной мере с наличием в составе генома этих органелл набора ппДНК. В пользу такого предположения свидетельствует обнаружение в нуклеотидной последовательности ппДНК размером 6397 н. п. (S1-ДНК) из митохондрий кукурузы гена ДНК-полимеразы вирусного типа [18]. На существование определенного сходства в способах репликации мтДНК животного происхождения и бактериальных векторных плазмид, несущих в своем составе репликационную плазмиды *ColEI*, указывают данные работы [9]. Авторами была установлена возможность репликации рекомбинантной плазмиды, полученной на основе *pBR322* и фрагмента мтДНК с *ORI*-последовательностью, в клетках *Escherichia coli* K-12, дефектных по ДНК-полимеразе I.

В целом, по нашему мнению, описанная модельная система может быть использована в дальнейшем как для изучения проблем репликации и транскрипции ДНК рекомбинантных плазмид в растительных митохондриях, так и в качестве мембранной системы доставки рекомбинантных ДНК в опытах по генетическому конструированию растений с использованием протопластов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grierson D., Covey S. Plant molecular biology.— Glasgow; London: Blackie, 1984.— 176 p.
2. Cloning vectors of mitochondrial origin for eukaryotes / K. Essers, U. Kuck, U. Stahl, P. Tudzynsky // Curr. Genet.— 1983.— 7, N 4.— P. 239—243.
3. Levings C. S., III. Cytoplasmic male sterility // Genet. eng. of plants: Agr. perspect. proc. symp.— New York; London, 1983.— P. 81—92.
4. Kemble R. J., Bedbrock J. R. Low molecular weight circular and linear DNA in mitochondria from normal and male sterile *Zea mays* cytoplasm // Nature.— 1980.— 288, N 5756.— P. 565—566.
5. Bedinger R., Walbot V. DNA synthesis in purified maize mitochondria // Curr. Genet.— 1986.— 10, N 8.— P. 631—637.
6. Carlson J. E., Brown G. L., Kemble R. J. In organello mitochondrial DNA and RNA synthesis in fertile and cytoplasmic male sterile *Zea mays* L. // Ibid.— 11, N 2.— P. 151—160.

7. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений.— Киев: Наук. думка, 1982.—102 с.
8. Кларк М., Рудельхюбер Т., Шей Дж. Методы генетики соматических клеток.— М.: Мир, 1985.— Т. 1.—311 с.
9. Replication of plasmid chimera *pBR-mtB-A* containing rat liver mtDNA fragment in *Escherichia coli* *polA* cells / Т. В. Kazakova, S. G. Babich, G. I. Golovina et al. // *Plasmid*.— 1982.—8, N 1.— P. 1—8.
10. Войников В. К., Лузова Г. Б., Лемзяков В. П. Действие холода на количество свободных жирных кислот и активность митохондрий у озимой ржи // *Физиология растений*.— 1981.—28, № 1.— С. 18—26.
11. Interaction of polynucleotides with natural and model membranes / V. G. Budker, A. A. Godovikov, L. P. Naumova, I. A. Slepneva // *Nucl. Acids Res.*— 1980.—8, N 11.— P. 2499—2515.
12. Будкер В. Г., Горохова О. Е., Соколов А. В. Транслокация ДНК через модельные фосфолипидные мембраны // *Докл. АН СССР*.— 1984.—278, № 2.— С. 479—481.
13. Маннатис Т., Фриш Э., Сэлбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—480 с.
14. Schegget J., Borsi P. DNA synthesis by isolated mitochondria. 1. Effect of inhibitors and characterization of the product // *Biochim. et biophys. acta.*— 1971.—246, N 2.— P. 239—248.
15. Kemble R. J., Gunn R. E., Flavell R. B. Classification of normal and male-sterile cytoplasm in maize. 2. Electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria // *Genetics*.— 1980.—95, N 3.— P. 451—458.
16. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*— 1979.—7, N 6.— P. 1513—1523.
17. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, P. J. Randall // *J. Biol. Chem.*— 1951.—193, N 1.— P. 265—275.
18. Kuzmin E. V., Levchenko I. V. S1 plasmid from *cms-S* maize mitochondria encodes a viral type DNA polymerase // *Nucl. Acids Res.*— 1987.—15, N 16.— P. 6758.

Сиб. ин-т физиологии и биохимии растений  
Сиб. отделения АН СССР, Иркутск  
Ин-т цитологии и генетики  
Сиб. отделения АН СССР, Новосибирск

Получено 08.02.88

#### DNA SYNTHESIS IN INTACT MAIZE MITOCHONDRIA TREATED BY *pBR* BACTERIAL VECTOR PLASMIDS

*Yu. M. Konstantinov, V. A. Podsonny, G. N. Lutsenko*

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,  
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Irkutsk

*M. I. Rivkin*

Institute of Cytology and Genetics,  
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

#### Summary

Fractions of high-molecular weight («chromosomal») and plasmid-like DNA from the isolated maize seedling mitochondria are synthesized with different rate. DNA of bacterial vector *pBR327* and *pBR322* plasmids is shown to be translocated into inner space of isolated mitochondria. Radioautographic analysis has been used to find the matrix activity of the supercoiled *pBR322* plasmid to synthesize DNA in the system of intact maize mitochondria. The model system described is assumed to be used to study the problems of replication and transcription of recombinant plasmid DNA in the plant mitochondria.