

## Summary

The radioresistance of yeast cell *Sacch. cerevisiae* is determined by several genes; their mutations result in the UV sensitivity (*uvs<sub>1</sub>*, *uvs<sub>2</sub>*) only or in the sensitivity to UV-light and ionizing radiation (*xrs<sub>2</sub>*, *xrs<sub>4</sub>*).

It is established that the cells of radiosensitive mutants show higher capacity for photoreactivation than the wild type cells.

The mutations *uvs<sub>1</sub>* and *uvs<sub>2</sub>* increase the frequency of the UV-induced mutations to serinresistance sharply, but *xrs<sub>2</sub>* and *xrs<sub>4</sub>* decrease it.

The experimental and literary considered data allow to affirm that UV-induced mutations appear as errors in repair process.

## ЛИТЕРАТУРА

- Захаров И. А. 1961. В сб.: Исслед. по генетике, 1. Изд. ЛГУ: 38—47.  
Захаров И. А., С. Г. Инге-Вечтомов. 1964. В сб.: Исслед. по генетике, 2. Изд. ЛГУ: 134—139.  
Захаров И. А., Т. Н. Кожина. 1967. ДАН СССР, 176, 6: 1418—1419.  
Захаров И. А., Т. Н. Кожина, И. В. Федорова. 1968. ДАН СССР, 181, 2: 470—472.  
Захаров И. А., Т. Н. Кожина, В. В. Кузнецов. 1968. Генетика, IV, 4: 78—82.  
Захаров И. А., Б. В. Симаров. 1966. Генетика, II, 3: 118—122.  
Лобашев М. Е. 1947. Вестник ЛГУ, 8: 10—29.  
Федорова И. В. 1969. Генетика, V, 12: 120—125.  
Boyce R. P., P. Howard-Flanders. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 51, 293.  
Chang L. T., J. E. Lennox, R. W. Tuveson. 1968. Mut. Res., 5: 217.  
Davies D. R., H. J. Evans. 1966. Adv. Rad. Biol., 2: 243.  
Davies D. R., S. Levin. 1968. Mut. Res., 5, 231.  
Harm W., B. Hillebrand. 1962. Photochem. Photobiol., 1: 271.  
Haynes R. H., 1964. I: Physical Progress in Radiation Biology. N. Y.  
Hill R. F. 1965. Photochem. Photobiol., 4: 563.  
Holliday R. 1967. Mut. Res., 4: 275.  
Howard-Flanders P. 1968. Ann. Rev. Biochem., 37, 175, 200.  
Howard-Flanders P., R. P. Boyce, L. Theriot. 1966. Genetics, 53: 1119.  
Miura A., J. Tomizawa. 1968. Mol. Gen. Genet., 103, 1.  
Nasim A. 1967. Genetics, 59: 327.  
Pauling C., L. Hamm. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci., 60: 1495.  
Pettijohn D., Ph. Hanawalt. 1964. J. Mol. Biol., 9: 395.  
Rupp W. D., P. Howard-Flanders. 1968. J. Mol. Biol., 31: 291.  
Setlow R. B. 1966. Current topics in radiation research, 2: 197.  
Setlow R. B., W. L. Carrier. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci., 51: 226.  
Smith K. C., A. C. Ganesan. 1969. Biophys. J., 9: 4.  
Witkin E. M. 1966a. Rad. Res. 6, suppl. 1: 30.  
Witkin E. M. 1966b. Science, 152, 1345.  
Witkin E. M. 1967. Brookhav. Symp. Biol., 20: 17.  
Witkin E. M. 1968. Proc. XII Intern. Congr. Genet., 2: 30.  
Witkin E. M. 1969. Mut. Res., 8: 9.

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ РЯДА ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ДНК АГЕНТОВ НА ГИГАНТСКИЕ ХРОМОСОМЫ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ НЕКОТОРЫХ ХИРОНОМИД

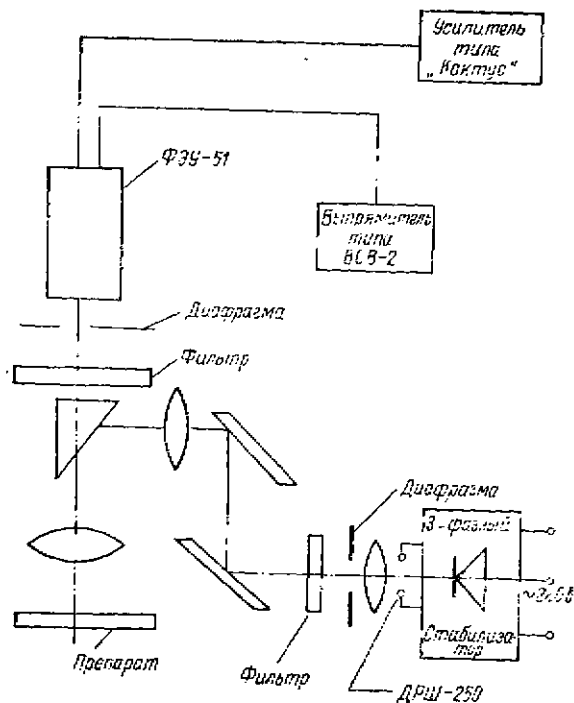
А. Ф. Смирнов, М. М. Цирульников, М. Г. Смарагдов

В настоящее время имеется относительно небольшое число работ, в которых изучаются закономерности воздействия ряда повреждающих нуклеиновые кислоты агентов на хромосомы, причем только в части из них используются точные физические методы (MacInnes, Uretz, 1966, 1967; Nash, Plaut, 1964). И в этих немногочисленных работах выводы делались на основании очень незначительного числа экспериментов и статистически не удостоверялись. В данном исследовании сделана попытка изучить воздействие ряда денатурирующих ДНК

агентов с помощью измерения интенсивности люминесценции акридинового сранжевого в комплексе с ДНК в двух областях спектра.

Материал и методы. В работе использовались хромосомы слюнных желез личинок рода *Chironomus* (*Ch. plumosus*, *Ch. dorsalis* и др.). Препараты получались по следующей методике, основанной на модификации метода Ристоу и Арендса (Ristow, Arends, 1968).

120 отпрепарированных желез помещали в центрифужную пробирку с 0,5 мл буфера 1 Ристоу. Далее добавили 0,01 мл 0,5% раствора проназы на 5 мин. После обработки ферментом количество буфера в пробирке доводили до 10 мл и далее добавляли 1 мл 10% раствора твина



Принципиальная блок-схема люминесцентного цитофотометра.

80 и 0,15 мл 10% раствора дезоксихолата натрия. Пробирку с выделенными железами помещали в холодильник на 20 мин для подавления активности фермента. В течение 10—15 мин в пробирке, взятой из холодильника, проводилось осторожное ресуспензирование для получения взвеси из разрушенных желез. Полученную взвесь фильтровали через двойной слой кисей. Фильтрат центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок подвергали окраске акридиновым оранжевым (разведение 1:1000 на исходном буфере, pH—7,0) в течение 10 мин. После окраски осадок подвергали двух-, трехкратной промывке. В полученный после отмывки осадок добавляли 1—2 капли исходного буфера и взвесь пипеткой переносили на предметное стекло, охлажденное на сухом льду. Предметные стекла слегка подсушивали. На высушенное стекло наносили каплю заключающей среды Шалумовича и заклеивали покровным стеклом. В результате получали ядра и хромосомы, свободные от цитоплазмы и лежащие на темном фоне, что способствовало количественным исследованиям.

В опытах проверяли воздействие ряда химических и физических агентов на структуру хромосомальной ДНК. Химическую и термическую обработку проводили перед окраской. В тех случаях, когда материал подвергался химическому воздействию, после обработки следовала двух-трехкратная промывка с последующим центрифугированием (5 мин при 1500 об/мин). Визуальное наблюдение люминесценции хромосом проводили на микроскопе МЛ-2. Степень нативности ДНК хромосом оценивали по величине коэффициента  $\alpha$ , равного отношению интенсивности люминесценции в красной и зеленой областях спектра (MacInnes, Uretz, 1966; Rigler, 1967; Зеленин, 1967). Значение коэффициента определялось на собранной нами установке для определения интенсивности люминесценции клеточных структур. Прибор собран на базе микроскопа МУФ-3М и принципиальная блок-схема его приведена на рисунке.

Таблица 1

Действие ряда физических и химических агентов на хромосомы в сериях с формальдегидом и без него  
(данные по сравнению результатов в сериях)

Агент	Кол-во хромосом	$\alpha$	$t_{dif}$	P
HCl				
1-я серия	10	3,3		
1-я серия, замер через 34 ч	20	1,7	2,7	0,02
2-я серия	20	5,1	6,4	0,01
CH <sub>3</sub> COOH				
1-я серия	20	2,8		
2-я серия	20	3,9	3,0	0,01
HCONH <sub>2</sub>				
1-я серия	20	1,3		
2-я серия	20	2,3	3,2	0,01
Термообработка				
1-я серия	20	3,8		
2-я серия	20	2,4	4,69	0,01
1-я серия, замер сразу	10	4,0		
1-я серия, замер через 44 ч	10	3,6	0,8	>0,05

Результаты и обсуждение. Были проведены следующие эксперименты:

**Контроль 1** — препараты хромосом, неподвергавшихся воздействию.

**Контроль 2** — хромосомы на 10 мин помещались в 20% раствор формальдегида.

**Серия 1:** а) химическая обработка 1 н. HCl, 49% CH<sub>3</sub>COOH, 97% формальдегидом HCONH<sub>2</sub> по 10 мин; б) термическая обработка (100±1)° в водяной бане 15 мин.

**Серия 2:** 12 HCl + 20% формальдегид (1:12), 98% CH<sub>3</sub>COOH + 40% формальдегид + дистиллированная вода (2:1:1); 4,3 мл 40% формальдегида + 20 мл 97% формальдегида. Все обработки по 10 мин.

**Серия 3:** обнаружены NH<sub>2</sub>-группы хромосомальных белков по методу Риглера (Rigler, 1966).

Измерения спектров проводили в ряде случаев в разное время после воздействия, что это учитывалось. Данные, полученные из опыта, а также коэффициенты нативности хромосом обработанных указаны в табл. 1 и 2.

В опытах по блокированию  $\text{NH}_2$  групп и в первом и втором контроле измеряли по 20 хромосом. Получены соответственно следующие значения  $\alpha$ : 1,3; 0,9; 1,0.

Для  $\text{CH}_3\text{COOH}$  визуально наблюдались примерно те же закономерности изменения характера люминесценции препаратов, что и для  $\text{HCl}$ , т. е. препараты из первой серии со временем меняли характер люминесценции. Для  $\text{HCl}$  более или менее стабильное значение  $\alpha$  в среднем наступало через 12—19 ч.

В вышеизложенных экспериментах флуорохромированию подвергались хромосомы, заключенные в ядерную оболочку или лишенные ее, т. е. в отличие от других экспериментов подобного рода отсутствовала клеточная мембрана (Nash, Plaut, 1964; Смирнов, Цирульников, 1969).

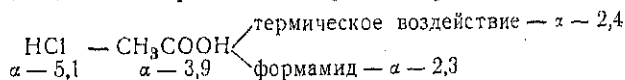
Таблица 2

Сравнение характера флуоресценции хромосом, обработанных рядом агентов и необработанных

Агент	$t_{\text{diff}}$	$P$
$\text{HCl}$		
1-я серия, замер через 24 ч . . . . .	4,12	0,01
$\text{CH}_3\text{COOH}$		
1-я серия . . . . .	8,65	0,01
2-я серия . . . . .	10,10	0,01
Термообработка		
1-я серия . . . . .	8,54	0,01
2-я серия . . . . .	9,20	0,01
Контроль 2 . . . . .	1,60	0,05
Блокировка $\text{NH}_2$ групп . . . . .	4,00	0,01

Ее отсутствие, очевидно, дало возможность работать уже с несколько меньшими концентрациями флуорохрома при использовании тех же цитохимических критериев. Согласно этим критериям нативная ДНК дает зеленую люминесценцию в комплексе с АО, однонитчатая ДНК — красную.

Эксперименты по воздействию на хромосомальную ДНК использованных денатурирующих агентов во всех случаях привели к достоверному сдвигу цвета люминесценции (изменение величины коэффициента  $\alpha$ ). Результаты этих опытов сведены в таблицу. По силе воздействия имеется тенденция к построению следующего ряда:



Сравнение результатов из 1-й и 2-й серий опыта и обнаруженное в этом случае достоверное различие позволяют говорить о том, что данные агенты вызывают именно денатурационные изменения. В пользу последнего предположения служит то, что во втором случае использовался формальдегид, который, с одной стороны, легче вступает в реакцию с денатурированной ДНК, а с другой — почти полностью блокирует ренатурационный процесс (Мармур и др., 1965). Сам же формальдегид не вызывает никаких изменений характера флуоресценции по сравнению с контролем (контроль 1:  $\alpha - 0,9$ ; контроль 2:  $\alpha - 1,0$ ,  $t_{\text{diff}} - 1,6$ ,  $P - 0,05$ ). Факт постепенного «выцветания» хромосом, обработанных  $\text{HCl}$ , косвенно указывает на то, что здесь происходит процесс денатурации-ренатурации, поскольку воздействие видимой части спектра

и ультрафиолета проверялось экспериментально. На некоторых других объектах подобный процесс был обнаружен. Риглером и др. (Rigler и др., 1969). В опытах этих авторов в отсутствие формальдегида охлаждения препарата обнаруживалась типичная ренатурационная кривая (Rigler и др., 1969). В наших опытах  $\alpha$  после «выцветания» стабилизируется не на уровне 0,9, как это должно быть в норме, а на значительно более высоком ( $\alpha$  с 7—8 изменяется через 12—19 ч до 3—4). Значит, в данном случае процесс ренатурации не доводится до конца, а происходит восстановление на 50—60% по отношению к норме. Таким образом, есть основание считать, что здесь имеет место нетождественное восстановление паранекротического состояния наследственного вещества по Лобашеву (1947). Согласно паранекротической гипотезе, такие нетождественные восстановления паранекротического состояния в дальнейшем могут реализоваться как мутации (Лобашев, 1947).

Нужно также отметить факт различного протекания процесса денатурации-ренатурации при воздействии на гигантские хромосомы указанных факторов. В случае формамида процесс ренатурации протекает быстро, и визуально даже трудно заметить какие-либо изменения (Nash, Plant, 1964). Более заметен этот процесс в случае кислотной денатурации. При термообработке остается непонятным наличие достоятельной разницы между нагревом в серии 1 и 2 ( $\alpha = 3,8$ ;  $\alpha = 2,4$ ).

Макиннес и Уретц (MacInnes, Uretz, 1966) считают, что характер флуоресценции гигантских хромосом очень сильно зависит от наличия ядерных белков, так как белки хромосом с помощью  $\text{NH}_2$  группы связывают  $\text{PO}_4^{---}$  группы ДНК и конкурируют с АО за связи с последними. В случае удаления хромосомальных белков или блокирования  $\text{NH}_2$  при такой трактовке следовало бы ожидать появления красной люминесценции. Наши эксперименты по ацетилированию препарата хромосом (связывание групп  $\text{NH}_2$ ) не привели к существенному сдвигу коэффициента ( $\alpha = 1,3$ ). И хотя мы имеем достоверное отличие от контроля ( $\alpha = 0,9$ ), но еще более значительно отличие от любого из экспериментов опытных серий (так, самый маленький коэффициент в серии 2:  $\alpha = 2,3$ ).

Очевидно, несмотря на то, что  $\text{NH}_2$  группы хромосомальных белков вносят какой-то вклад в процесс связывания АО с ДНК хромосом, все же, нам кажется, нельзя объяснять красный цвет люминесценции хромосом после обработки трипсином (MacInnes, Uretz, 1966) только снятием блока белков, приводящим к освобождению боковых связей нуклеиновых кислот для последующего связывания с акридином. Возможно, трипсин, удаляя хромосомальные белки, тем самым устраняет экран с одноименно заряженных групп  $\text{PO}_4^{---}$ , а далее в результате электростатического отталкивания происходит какое-то изменение конформации ДНК. Это объяснение тоже приводит к ряду противоречий. Необходимо изучить этот вопрос подробнее.

Тема этой статьи была предложена М. Е. Лобашевым, который постоянно проявлял интерес к работе и оказывал помощь в ходе экспериментов.

## ВЫВОДЫ

1. Клеточная мембрана каким-то образом препятствует проникновению АО в цитоплазму клеток слюнных желез.
2. Показано количественно, что  $\text{HCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCONH}_2$ , термическая обработка вызывают увеличение коэффициента  $\alpha$ .
3. Имеется тенденция к построению определенного ряда по силе воздействия на хромосомы (сдвиг величины  $\alpha$  вышеперечисленными агентами).

4. Есть основание полагать, что воздействие данных физических и химических агентов на хромосомальную ДНК является процессом денатурации-ренатурации.

5. В случае HCl обнаружено неполное восстановление первоначальной величины коэффициента  $\alpha$ , которое объясняется нетождественной ренатурацией.

6. NH<sub>2</sub> группы хромосомальных белков вносят какой-то вклад в процесс связывания АО с ДНК:

### Summary

The effect of several agents on chromosomes obtained from salivary glands of *Chironomus* has been studied by the method of luminescent analysis.

It has been shown that the treatment with HCl, acetic acid, formamide and high temperature changes the spectrum of luminescence of the giant chromosomes comparing to the control. In case of treatment with HCl it has been found that as a result of denaturation the coefficient  $\alpha$  have incomplete restoration comparing to the original value. The agents studied are ordered in a row according to the level of their denaturing effect.

The effect of NH<sub>2</sub>-groups of chromosomal proteins on the type of fluorescence of chromosomes was not significant.

### ЛИТЕРАТУРА

- Зеленин А. В. 1967. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот. М., «Наука».  
Лобашев М. Е. 1947. Вестник ЛГУ, 8: 10.  
Мармур Д., Р. Раунд, К. Шильдкраут. 1965. В сб.: Нуклеиновые кислоты. М., «Мир»: 238.  
Смирнов А. Ф., М. М. Цирульников. 1969. В сб.: Механизмы биологических процессов. Изд. ЛГУ, 19.  
MacInnes J. W., R. B. Uretz. 1966. Proc. Natl. Acad. Sci., 55: 1109.  
MacInnes J. W., R. B. Uretz. 1967. J. Cell. Biol., 33: 597.  
Nash D., W. Plaut. 1964. Proc. Natl. Acad. Sci., 51: 731.  
Rigler R. 1967. Acta Physiol. Scand., 67, suppl. 267.  
Rigler R., D. Killander, L. Bollund, N. R. Ringertz. 1969. Exp. Cell. Research, 55: 215.  
Ristow H., S. Arentz. 1968. Bioch. et Biophys. Acta, 157: 178.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА ТЕМПЕРАТУРНОГО ПОСЛЕДЕЙСТВИЯ НА ЧАСТОТУ ВТОРИЧНОГО НЕРАСХОЖДЕНИЯ И ПОТЕРИ X-ХРОСОМ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ САМОК ДРОЗОФИЛЫ\*

М. М. Тихомирова, Н. В. Глотов

Одним из основных феноменов, наблюдаемых при изучении радиационно-индуцированной анеуплоидии по X-хромосоме в оогенезе дрозофилы, является значительное преобладание числа самцов XO над числом самок XXU в потомстве облученных самок. С увеличением дозы облучения это преобладание становится все более выраженным. Анализ разнообразных экспериментальных данных — кривых, доза-эффект (Traut, 1962, 1964), зависимости частоты радиационно-индуцированных гипоплоидов от размера хромосомы (Grell, Mupoz, Kirschbaum, 1966; Закиев, Глотов, 1969), сравнительной эффективности рентгеновых лучей и быстрых нейтронов (Тимофеев-Рессовский и др., 1971) и, наконец, эффекта температурного последствия (Тихомирова, 1961, 1967; Тихоми-

\* Работа выполнена в Ленинградском государственном университете на кафедре генетики и селекции и в Институте медицинской радиологии АМН СССР в Обнинске.