

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
КЛИК-РЕАКЦИИ 5-ЭТИНИЛ-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНА С АЗИДАМИ
ФЛЮОРОХРОМОВ В ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА
И МЕТАБОЛИЗМА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДОВ

© 2014 г. А. В. Носов*, А. А. Фоменков*, А. С. Мамаева*, А. Е. Соловченко*.,**, Г. В. Новикова*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

**Биологический факультет

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 21.05.2014 г.

Начиная с пионерской работы Salic и Mitchison (2008), активно расширяется применение аналога тимидина — 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) для выявления клеток, реплицирующих ДНК. После включения в ДНК этот нуклеозид можно обнаружить по флюоресценции после клик-реакции азид-алкинового циклоприсоединения с азидами флюорохромов. Недавно появились адаптированные для клеток растений протоколы применения EdU в сочетании с клик-реакцией для мониторинга S-периода клеточного цикла в меристемах корней и культивируемых *in vitro* клетках с использованием микроскопии и проточной цитометрии. В данной работе мы уделили внимание некоторым деталям имеющихся методов и их модификациям, а также рекомендовали новые протоколы. В частности, предложили сочетать включение EdU в клетки, реплицирующие ДНК, с последующим выделением протопластов и их подготовкой для микроскопического анализа и проточной цитометрии. Кроме того, предложен метод определения динамики фосфорилирования EdU в клетках *in vivo*.

Ключевые слова: Arabidopsis thaliana — Chlamydomonas reinhardtii — Synechocystis — Vigna radiata — клеточный цикл — культура клеток — нуклеотиды — S-период — протопласты — проточная цитометрия — тимидинкиназа — флуоресцентная микроскопия

DOI: 10.7868/S0015330314060141

ВВЕДЕНИЕ

В клеточном цикле (КЦ) можно выделить два определяющих этапа. Один из них — митоз, во время которого происходят заметные структурные изменения, вызванные равным распределением между дочерними клетками ядерной ДНК, упакованной в хромосомы. Название “хромосома” связано со способностью этих структур интенсивно окрашиваться цитологическими красителями, что вкупе с их достаточно крупными раз-

мерами уже долгое время определяет плодотворность исследований хромосом, в первую очередь различными микроскопическими методами. Второй важный и масштабный процесс — репликация ДНК, проходящий без видимых структурных изменений. Именно этот этап связывает воедино периоды КЦ и определяет успешность непрерывной передачи идентичной наследственной информации в ряду поколений.

Безусловно, что возможность оперативной визуализации клеток, находящихся в периоде репликации ядерной ДНК (S-периоде/S-фазе КЦ), важна для различных областей биологии и физиологии клетки, в том числе при изучении регуляции КЦ, в исследованиях ответа клеток на стрессорные факторы, в скрининге ингибиторов репликации ДНК и т.д.

Известно, что клетка требует сбалансированного снабжения всеми четырьмя дезоксирибону-

Сокращения: ДМСО — диметилсульфоксид; ДППЦ — двухпараметрическая проточная цитометрия; дТ — тимидин; КЦ — клеточный цикл; ТК — тимидинкиназа; 7-AAD — 7-аминоактиномицин D; BrdU — 5-бром-2'-дезоксинуридин; DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндолил; EdU — 5-этинил-2'-дезоксинуридин; ММС — митрамицин А; PBS — фосфатно-солевой буфер; PI — пропидиум йодид.

Адрес для корреспонденции: Носов Александр Владимирович. 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Факс: +7 (499) 977-80-18; электронная почта: alexv.nosov@mail.ru

клеозидтрифосфатами — непосредственными предшественниками синтеза ДНК [1]. Тимин — уникальное для ДНК азотистое основание, поэтому его нуклеотиды вовлекаются в построение только этой макромолекулы, но использование каким-либо способом маркированного дТТФ для выявления синтеза ДНК в живых клетках, в том числе клетках растений, затруднительно из-за плохой проницаемости плазмалеммы для нуклеозидфосфатов. Однако нуклеозиды, в том числе тимидин (дТ), легко попадают в клетку с помощью соответствующих транспортеров [2]. Поступив в клетку, дТ фосфорилируется специфической тимидинкиназой (ТК; КФ 2.7.1.21) либо дезоксирибонуклеозидкиназой (КФ 2.7.1.145) с образованием дТМФ и далее в процессе последовательных киназных реакций образуется дТТФ — субстрат для ДНК-полимеразной реакции.

Классический метод выявления клеток, находящихся в S-периоде, связан с использованием меченого тритием тимидина с последующей радиоавтографической детекцией включившегося в ДНК предшественника [3]. Этот метод активно применялся в течение полувека, и на его счету основные открытия в клеточной кинетике и исследованиях КЦ. Тем не менее, радиоавтографическая детекция включившегося в ДНК предшественника достаточно трудоемка и занимает продолжительное время (до нескольких недель экспозиции препаратов под фотоэмульсией). Кроме того, было желание заменить радиоактивный нуклеозид более безопасными соединениями. На помощь пришли 5-галоид-замещенные аналоги дТ, такие как 5-бром-2'-дезоксиуридин (BrdU) и 5-йод-2'-дезоксиуридин. Аналоги дТ, как правило, легко транспортируются в клетку и вовлекаются в метаболизм дезоксирибонуклеозидкиназами и/или ТК. После включения аналогов дТ в ДНК их выявляют с помощью специфичных моноклональных антител. Метод занимает значительно меньше времени, чем радиоавтография, но имеет следующие недостатки: (1) требуется денатурация ДНК (соляной кислотой, формамидом, нагреванием и т.п.) для взаимодействия эпитопов 5-галоид-замещенных аналогов дТ с антителами, что нарушает структуру ДНК и антигенные свойства ядра и клетки; (2) антитела плохо проникают в объемные образцы, и особое препятствие для антител создает клеточная стенка растений, которую необходимо разрушать [4–6].

В последние годы было предложено [4] и активно расширяется применение аналога дТ — 5-этинил-2'-дезоксиуридина (EdU) — для выявления клеток, реплицирующих ДНК. После включения в ДНК этот предшественник легко обнаруживается в клик-реакции (реакции, пред-

назначенной для быстрого и надежного получения новых молекул путем соединения отдельных элементов) азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемой Cu(I), впервые описанной в 2002 г. в работах двух независимых групп экспериментаторов [7, 8]. Терминальная алкиновая группа EdU реагирует с азидами флюорохромоов (например с азидом Alexa Fluor 488), формируя стабильные ковалентные связи. Этот метод не требует жесткой денатурации ДНК, разрушения клеточной стенки, дополнительной пермеабиллизации плазмалеммы и ядерной мембраны и позволяет сократить время процедуры выявления клеток, реплицирующих ДНК, по крайней мере, в три раза по сравнению с протоколом, использующим BrdU и иммунодетекцию [4–6].

После работы Vanstraelen с соавт. [9], в которой применяли 24-часовую экспозицию корней *Arabidopsis* с EdU для выяснения роли гена *CCS52A2* в функционировании покоящегося центра меристемы корня, в 2010 г. появилась первая подробная статья Kotogány с соавт. [5] о методах использования EdU в сочетании с клик-реакцией для мониторинга S-периода КЦ в меристемах корней и культивируемых *in vitro* клетках с применением микроскопии и проточной цитометрии. В обзоре 2014 г. [10] были кратко проанализированы имеющиеся к настоящему времени 20 публикаций, в которых репликацию ДНК в клетках и тканях растений выявляли с помощью EdU с последующей клик-реакцией с азидами флюорохромоов. Большинство работ было посвящено анализу доли S-фазных клеток в различных тканях; изменению репликации ДНК в мутантных и трансгенных растениях; характеристике “образа” репликации на уровне хромосом и хроматина.

Безусловно, практика использования EdU в экспериментальной биологии растений будет расширяться. В связи с этим в настоящем исследовании мы сосредоточили внимание на методических деталях имеющихся и модифицированных протоколов, а также попытались дополнить возможные области применения EdU в клик-реакции с азидами флюорохромоов для физиологии и биохимии клеток растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Суспензионные культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. двух генотипов: дикого типа Col-0 (экотип Columbia) и мутанта *ein2-1* (EIN2 — один из компонентов пути передачи сигнала этилена), были получены из каллусов листового происхождения. Культуры клеток выращивали в среде Schenk и Hildebrandt (SH) [11] с 3% сахарозы, 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л ки-

нетина в стеклянных колбах в темноте при температуре 26°C и постоянном перемешивании (120 качаний/мин). Период субкультивирования—10 дней. Семена растений Col-0 [N1092] и *ein2-1* [N3071] были предоставлены Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC, Великобритания).

Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT был любезно предоставлен Dr. N. Murata (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Япония). Его выращивали на среде BG11 [12], в которую добавляли необходимое количество 20 мМ Нерес-NaOH до pH 7.6. Штамм *Chlamydomonas reinhardtii* 137C+ IPPAS L-1014 выращивали на среде TAP [13]. Культивировали водоросли в 300-миллилитровых колбах в 80 мл среды при температуре 25°C, постоянном перемешивании (70 качаний/мин) и постоянном освещении люминесцентными лампами интенсивностью 35 мкмоль фотонов/(м² с).

Семена *Vigna radiata* L. сорта Verken промывали, замачивали в теплой воде на 1 ч, снимали семенную кожуру и проращивали в течение суток в темноте при 25°C в ячейках 12-луночной плашки в небольшом объеме воды, покрывавшем не более половины семени.

Инкубация с EdU и фиксация клеток и тканей. В логарифмической фазе роста (3–5-е сутки) отбирали аликвоты суспензионных культур клеток *Arabidopsis* и добавляли 10–20 мкМ EdU (“Invitrogen”, кат. № A10044) из 10 мМ раствора в диметилсульфоксиде (DMCO). Клетки инкубировали при 26°C на шейкере (120 качаний/мин): для выявления S-фазных клеток — в течение 30–120 мин, для определения пула клеток, способных к репликации ДНК, — в течение 2–3 суток. Клетки водорослей и цианобактерий отбирали на третьи сутки культивирования и инкубировали 2 ч с 20 мкМ EdU. К проращиваемым семенам *Vigna radiata* EdU (10 мкМ) добавляли на сутки сразу же после снятия семенной кожуры.

Если инкубацию с EdU проводили непродолжительное время, то его включение в синтезирующуюся ДНК останавливали добавлением 200 мкМ тимидина (дТ, “Sigma-Aldrich”, кат. T9250) в виде водного 10 мМ раствора. Клетки выдерживали с дТ 5 мин и либо фиксировали, либо выделяли из них протопласты (см. ниже). В качестве фиксатора для клеток *Arabidopsis* применяли 4% формалин (использовали забуференный 10% раствор “Sigma-Aldrich”, кат. № HT50-1-1) в PBS (2.7 мМ KCl, 1.47 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 8 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4) с 0.1% Triton X-100. Водоросли фиксировали 4% формалином в PBS без Triton X-100, либо в 70% холодном метаноле. Корешки *Vigna* выдерживали 1 ч в 0.05% водном растворе колхицина (“Sigma-Aldrich”, кат. № C3915), затем 1 ч во льду

и фиксировали в смеси метанола и пропионовой кислоты (3 : 1).

Выделение и фиксация протопластов. В стеклянных 100-миллилитровых стаканах смешивали равные объемы суспензии клеток (обычно 5 мл) и подогретого до 28°C раствора, содержащего макросоли среды SH, 0.8 М сорбита, 8 мМ CaCl₂, 25 мМ Mes-KOH (pH 5.7), 2% целлюлазы Onozuka R10 (“Kinki Yakult”, Япония), 0.3% пектиназы Macerozyme R10 (“Kinki Yakult”), 0.8% гемицеллюлазы Driselase (“Fluka”). Раствор ферментов готовили заранее, осветляли центрифугированием и замораживали. Протопласты выделяли при 26°C на шейкере (120 качаний/мин) в течение 1.0–1.5 ч.

Суспензию протопластов пропускали через нейлоновую сетку с ячейками 40 мкм и переносили в 10-миллилитровые пластиковые пробирки. Протопласты осаждали центрифугированием при 100 g в течение 5 мин в бакет-ротаторе при комнатной температуре, осадок протопластов ресуспендировали в 10 мл 0.5 М сорбита с 2.5 мМ CaCl₂ (Сорб-Са) выдерживали 5 мин и центрифугировали (100 g, 5 мин), отмывку повторяли, к осадку добавляли Сорб-Са до 1.5 мл, суспензию по каплям добавляли к 3.5 мл холодного (4°C) метанола в 5-миллилитровые пробирки и выдерживали 20–30 мин.

Фиксированные в 70% метаноле протопласты хранятся при 4°C в течение 2–3 недель. Протопласты можно фиксировать 3–4% раствором формальдегида. Для этого к 2 мл суспензии протопластов в Сорб-Са добавляли 2 мл двукратного фиксатора, приготовленного следующим образом: в 5 мл дистиллированной воды растворяли 1.82 г сорбита, добавляли 2 мл Mops (0.5 М, pH 7.0), 4 мл 36.5% формальдегида (“Sigma-Aldrich”, кат. № F8775), 100 мкл 1 М MgCl₂ и довели объем до 20 мл. Фиксировали протопласты не менее 15 мин. В формалиновом фиксаторе протопласты можно хранить при 4°C в течение недели, при необходимости длительного хранения их следует перевести в 70% метанол.

Основной протокол выявления включившегося в ДНК EdU при помощи клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488. Включение EdU выявляли при помощи реакции с азидом Alexa Fluor 488, хотя в настоящее время коммерчески доступны и азиды других флюорохромоов, перекрывающие весь видимый спектр и пригодные для многоцветного мечения клеток.

В стандартном протоколе для детекции EdU мы использовали Click-iT EdU Alexa Fluor 488 HCS assay (“Invitrogen”, кат. № C10350). Фиксированные клетки *Arabidopsis* три раза отмывали в

PBS и оставляли по 20–30 мкл упакованного объема клеток в пробирках Eppendorf. В каждую пробирку добавляли по 150 мкл реакционной смеси, собранной в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя в следующей последовательности: 113.3 мкл H₂O + 15 мкл 10× буфера реакции (компонент С) + 6 мкл CuSO₄ (компонент D) + 0.7 мкл азида Alexa Fluor 488 (компонент В) + 15 мкл однократного buffer additive (компонент E; замороженный 10× раствор разводили водой непосредственно перед окраской). Реакционная смесь не хранится и должна быть использована сразу после приготовления. Отметим, во-первых, что мы увеличили количество флюорохрома в 2 раза (здесь возможна оптимизация) и, во-вторых, во многих публикациях ссылаются на протокол Kotogány с соавт. [5], однако следует обратить внимание, что в этом тексте [5] перепутаны названия и буквенные обозначения компонентов, тогда как последовательность их добавления очень важна.

Клетки после клик-реакции (экспозиция 30 мин при комнатной температуре в темноте) промывали 200 мкл компонента F или PBS с 2 мМ азидом натрия, затем 1 мл PBS и для окраски ядер PBS – со 100 нг/мл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, “Sigma-Aldrich”, *кат. № D9542*) из сток-раствора (250 мкг/мл в воде). Окрашенные клетки можно хранить при 4°C несколько дней.

Клик-реакция катализируется ионами Cu(I), которые могут легко образовываться при использовании CuSO₄ в присутствии редуцирующих агентов, таких как аскорбат натрия. Поэтому кроме реакционного коктейля, предлагаемого “Invitrogen”, мы дополнительно применяли еще две композиции в качестве среды для клик-реакции.

Среда 1. Модифицированная реакционная среда Salic и Mitchison [4]: вода (до необходимого финального объема) + 100 мМ Tris-HCl (pH 8.0) + 2 мМ CuSO₄ + 5 мкМ азида Alexa Fluor 488 (“Invitrogen”, *кат. № A10266*) из 1 мМ сток-раствора в ДМСО + 100 мМ аскорбата натрия (“Sigma-Aldrich”, *кат. № A7631*) из 0.5 М свежеприготовленного раствора.

Среда 2. PBS (до необходимого финального объема) + 2 мМ CuSO₄ + 5 мкМ азида Alexa Fluor 488 + 100 мМ аскорбата натрия.

Отметим, что соблюдение очередности добавления компонентов и использование свежеприготовленных растворов – важные факторы успешной реакции. Ощутимых различий в окраске при использовании коммерческого набора “Invitrogen” и предлагаемых реакционных сред 1 и 2 мы не наблюдали. Выбор зависит от совмести-

мости последующих после окраски процедур с той или иной буферной системой.

Протокол для протопластов. Фиксированные в метаноле или формалине протопласты два раза отмывали в 0.5 М сорбите без кальция, центрифугируя по 7–10 мин при 100 g, затем промывали в PBS с 0.1% Triton X-100 и PBS (между центрифугированиями протопласты инкубировали по 10 мин), к осадку добавляли 1 мл PBS, суспензию переносили в 1.5-миллилитровые пробирки Eppendorf, центрифугировали и к 20–30 мкл осадка добавляли 150 мкл реакционной смеси для клик-реакции. Спустя 30 мин протопласты вновь центрифугировали, промывали 200 мкл компонента F или PBS с 2 мМ азидом натрия, затем избытком PBS и 1 мл PBS с одним из флюорохромоов, окрашивающих ДНК: 100 нг/мл DAPI; 5 мкг/мл PI (пропидиум йодид, “Fluka”, *кат. № 81845*) из сток-раствора 1 мг/мл в воде с 0.1% азидом натрия; 25 мкг/мл ММС (митрамицин А, “Serva”, *кат. № 29803.01*) из сток-раствора 2.5 мг/мл в воде с 10 мМ MgCl₂ и 0.1% азидом натрия; 15 мкг/мл 7-AAD (7-аминоактиномицин D, “Molecular Probes”, *кат. № A1310*) из сток-раствора 500 мкг/мл в ДМСО. Ядра достаточно окрашивать 10–20 мин, но можно оставлять при 4°C на 2–3 суток.

Протокол для протопластов с РНКазной обработкой. Концентрированный раствор РНКазы готовили следующим образом: РНКазу А (“Sigma-Aldrich”, *кат. № R5500*) в концентрации 10 мг/мл растворяли в 10 мМ Tris-HCl (pH 7.6) с 15 мМ NaCl и прогревали 20 мин при 95°C. Затем раствор медленно охлаждали до комнатной температуры, центрифугировали при 10000 g, разливали по 200 мкл в 0.5-миллилитровые пробирки Eppendorf и замораживали.

Фиксированные протопласты центрифугировали 10 мин при 100 g, удаляли фиксатор, добавляли к осадку 5 мл 0.5 М сорбита без кальция, инкубировали 20 мин (периодически суспензию протопластов аккуратно перемешивали), центрифугировали 10 мин при 120 g, повторяли промывку 0.5 М сорбитом. Затем удаляли сорбит, к осадку протопластов добавляли 4 мл PBS с 0.5% Triton X-100 и инкубировали 30 мин. Протопласты центрифугировали 10 мин при 200 g, промывали PBS, к осадку добавляли 0.5 мл раствора РНКазы (в теплый PBS (37°C) с 2.5 мМ ЭДТА-На вносили необходимое количество сток-раствора РНКазы до конечной концентрации 100 мкг/мл) и затем инкубировали 1 ч при 37°C. После обработки РНКазой протопласты осаждали (10 мин 200 g), два раза промывали PBS и переносили в 1.5-миллилитровые пробирки и оставляли по 30–

50 мкл упакованного объема протопластов. Далее добавляли 150 мкл реакционной смеси для клик-реакции. Спустя 30 мин протопласты центрифугировали, промывали 200 мкл компонента F или PBS с 2 мМ азидом натрия, затем PBS и 1 мл PBS с флюорохромами: 100 нг/мл DAPI или 5 мкг/мл PI (10 мкг/мл PI для проточной цитометрии).

Выявление включившегося в ДНК EdU в клетках водорослей и корешках *Vigna*. Фиксированные клетки водорослей осаждали (3 мин при 2000 g), инкубировали 10 мин в 70% метаноле, центрифугировали, промывали дважды по 10 мин 70% метанолом и дважды PBS, затем инкубировали в PBS с 0.1% Triton X-100, отмывали PBS и переносили в 1.5- миллилитровые пробирки. К 30–50 мкл осадка клеток добавляли 200 мкл реакционной среды (композиция 1 на Tris-буфере), инкубировали 30 мин в темноте. Далее клетки промывали PBS с 2 мМ азидом натрия и PBS, затем к осадку добавляли 80% холодный ацетон и выдерживали 10 мин, центрифугировали, удаляли ацетон и повторяли процедуру еще 2 раза. После промывки PBS клетки окрашивали DAPI (100 нг/мл в PBS).

Фиксированные корешки *Vigna* два раза отмывали 70% метанолом (по 10 мин), затем водой и 1.5 ч инкубировали в 45% уксусной кислоте. Далее материал дважды отмывали водой, PBS, выдерживали 20 мин в PBS с 0.2% Triton X-100, промывали два раза PBS и проводили в течение 1 ч клик-реакцию с азидом Alexa Fluor 488 в реакционной среде с PBS (композиция 2). После промывок в PBS с 2 мМ азидом натрия и PBS корешки окрашивали DAPI и готовили давленные препараты.

Флюоресцентная микроскопия и проточная цитометрия. Непосредственно перед микроскопическим анализом протопласты, клетки и ткани отмывали PBS от избытка флюорохромов (DAPI, PI, ММС, 7-ААД). В работе использовали микроскоп Univar (“Reichert-Jung”, Австрия) с цифровой камерой Canon PowerShot G6 и блоками фильтров: 42 (Ex 18 × 2 UG1; отражение до 420 нм; поглощение 18 × 3 KV 418/VG) для DAPI; 45 (Ex 18 × 2 BG3; отражение до 450 нм; поглощение 18 × 3 KV 418/VG) для ММС; 51 (Ex 18 × 4 VG9; отражение до 510 нм; поглощение 18 × 3 RG645/VG) для Alexa Fluor 488, PI и 7-ААД. Микроскоп Axio Imager Z2 (“Zeiss”, Германия) с цифровой камерой AxioCam MR и блоками фильтров: 44 (Ex BP 475/40; Em BP 530/50) для Alexa Fluor 488; 02 (Ex G365; Em LP420) для DAPI; 43 (Ex BP 550/25 HE; Em BP 605/70 HE) для PI. Изображения обрабатывали в программе AxioVision 4.8.

Для двухпараметрического анализа флюоресценции протопластов окрашенных PI и Alexa Fluor 488 использовали проточный цитометр Guava easyCyte 6HT (“Merck Millipore”, Германия) с капилляром внутреннего диаметра 100 мкм, возбуждающим аргон-ионным лазером 488 нм, двумя детекторами (525/30 нм для Alexa Fluor 488 и 680/30 нм для PI) и программным обеспечением InCyte.

Определение динамики фосфорилирования EdU в культуре клеток *Arabidopsis*. Данный протокол основан на методике Wolcott и Colacino [14], где использовали свойство ионов La осаждать фосфаты, в том числе и нуклеозидфосфаты, для определения *in vitro* тимидинкиназной активности с радиоактивными субстратами. Перед экспериментом суспензию клеток *Arabidopsis* Col-0 в логарифмической фазе роста пропускали через сито с ячейками 1–2 мм в широкий стакан и помещали на магнитную мешалку.

Отбор и фиксация проб. Два миллилитра суспензии клеток с помощью вакуумного насоса фильтровали через стекловолоконный фильтр GF/C (“Whatman”, *кат. № 1822-021*), закрепленный в разъемном тefлоновом фильтродержателе на колбе Бунзена. Сырую массу клеток, сформировавшуюся на фильтре в виде “таблетки”, быстро помещали на латунный столик, охлаждаемый жидким азотом. Замороженную массу клеток переносили в полипропиленовую пробирку с фильтрующей вставкой с порами 10 мкм (VectaSpin Micro, “Whatman”, *кат. № 6838-0002*), затем пробирку помещали в морозильник (–20°C). Несколько отфильтрованных проб без замораживания (до и после окончания эксперимента) взвешивали для определения равномерности отбора.

Эксперимент. В стакан с перемешиваемой суспензией клеток добавляли 25 мкМ EdU. Через 2, 4, 6, 8 мин отбирали по 2 мл суспензии, фильтровали, как описано выше, и до формирования на фильтре плотного осадка клетки промывали 2 мл 1 мМ дТ. Далее – по протоколу отбора и фиксации проб. Повторный эксперимент проводили через 40 мин на суспензии клеток, параллельно культивируемой в другой колбе.

Пробирки VectaSpin с замороженной массой клеток оттаивали при 4°C, затем центрифугировали при 1500 g 30 мин (при 4°C), и отфильтрованный клеточный сок переносили в предварительно взвешенные 1.5-миллилитровые пробирки Eppendorf. После определения количества клеточного сока его объем выравнивали холодной деионизованной водой, затем добавляли равное количество 200 мМ Tris-HCl (pH 8.0) с 10 мМ NaF и по 200 мкл реакционной среды (компози-

ция 1 на Tris-буфере). Через 30 мин в пробирки добавляли необходимый объем 100 мМ раствора дТМФ (в качестве балластного нуклеозидфосфата) до концентрации 5 мМ, затем 1 мл 100 мМ раствора LaCl_3 с 5 мМ триэтаноламином. Образцы тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 1500 g. Осадки промывали 1 мл LaCl_3 , растворяли в 200 мкл 0.05 М HCl и раствор переносили в лунки 96-луночной плашки с плоским дном. Интенсивность флюоресценции Alexa Fluor 488, ковалентно связанной с EdU-фосфатами, определяли с помощью Typhoon Trio⁺ Imager (“GE Healthcare Life Sciences”, Швеция) при Ex 480 и Em BP 520/40. В качестве контроля использовали клик-реакцию с клеточным соком без инкубации клеток с EdU.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие ТК определяет фосфорилирование и включение EdU в реплицирующуюся ДНК

Как уже отмечалось, для включения EdU в молекулу реплицирующейся ДНК необходимо наличие фосфорилирующих его ферментов – ТК или дезоксирибонуклеозидкиназы, которые отсутствуют у многих морских и пресноводных цианобактерий [15, 16]. Например, чтобы выявить асинхронность репликации мультикопийных хромосом *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Watanabe с соавт. [16] сконструировали штамм *S. 7942*^{ТК}, экспрессирующий ген *ТК* вируса герпеса. Клетки штамма *S. 7942*^{ТК} были способны включать BrdU (аналог дТ) в реплицирующиеся молекулы ДНК, затем включение BrdU выявляли с помощью специфичных антител. Выявление и субклеточная локализация репликации ДНК, но уже с помощью EdU, в клетках *Schizosaccharomyces pombe* также были сопряжены с необходимостью конструирования штамма, экспрессирующего ген *ТК* вируса герпеса и ген *hENT1*, кодирующий транспортер нуклеозидов. Для гипертермофильных архей *Sulfolobus* sp. применение EdU для мониторинга репликации ДНК стало возможным после получения штаммов, экспрессирующих *ТК* другого рода термоустойчивых архей [17, 18].

В нашей работе мы исследовали возможность включения EdU в ДНК хорошо известного модельного штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT, геном которого не содержит ген *ТК*. После 2 ч инкубации с 20 мкМ EdU, фиксации (в метаноле или формалине), клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488 и дополнительного удаления хлорофилла и других пигментов ацетоном не было обнаружено ни одной “EdU-позитивной” клетки *Synechocystis* (рис. 1а–1в).

В отличие от цианобактерий многие одноклеточные зеленые водоросли вооружены ТК, в том числе *Chlamydomonas reinhardtii*, из клеток которой этот фермент был выделен [19].

С помощью флюоресцентной микроскопии мы выявили 5–6% “EdU-позитивных” клеток *C. reinhardtii* (рис. 1д) после 2 ч инкубации с 20 мкМ EdU и последующей клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488. При этом отметим, что культуру не синхронизировали и культивировали при слабой интенсивности света. Из-за большого содержания зеленых пигментов фиксация в метаноле и промывка в метаноле недостаточны для выявления включения EdU. Только дополнительная трехкратная обработка холодным ацетоном позволила обнаружить сигнал Alexa Fluor 488 в клетках *C. reinhardtii*.

Таким образом, инкубацию клеток цианобактерий и зеленых водорослей с EdU с последующей клик-реакцией с азидом флюорохромома можно применять не только для выявления клеток, реплицирующих ДНК, но и как экспрестест на наличие ТК и/или дезоксирибонуклеозидкиназы в исследуемых организмах. Это может быть полезным первичным признаком при их систематике. Кроме того, следует отметить устойчивость к обработке ацетоном присоединенной к ДНК метки Alexa Fluor 488.

Успешное полувековое использование дТ и его аналогов в исследованиях КЦ и репликации ДНК у высших растений указывает на безусловное наличие у этих организмов ферментов, фосфорилирующих дТ. Тем не менее, ТК растений свое признание получила не сразу. Ранние работы Hotta и Stern [20] на микроспорах *Lilium longiflorum* показали, что активность ТК появлялась незадолго до синтеза ДНК и совпадала с нарастанием пула дезоксирибонуклеозидфосфатов и индуцировалась дТ. Затем функционирование ТК в клетках растений подвергли сомнению [21] и предположили, что за фосфорилирование дТ отвечает нуклеозидфосфотрансфераза (КФ 2.7.1.77). В дальнейшем удалось выделить и очистить ТК из кормовых бобов [22] и уже совсем недавно идентифицировать в геноме *Arabidopsis* два гена *ТК* [23].

Опыт показал, что при анализе количества S-фазных клеток в экспериментах с большим числом вариантов (например, при изучении влияния каких-либо эффекторов на КЦ) и коротких экспозициях с EdU необходимо останавливать его включение в ДНК, инкубируя клетки и ткани с избытком дТ. Конкурентное ингибирование дТ включения EdU в ДНК мы продемонстрировали на культивируемых клетках *Arabidopsis* Col-0 (рис. 1е). В варианте с предварительной 10-минутной экспозицией с дТ (400 мкМ) и затем 30-

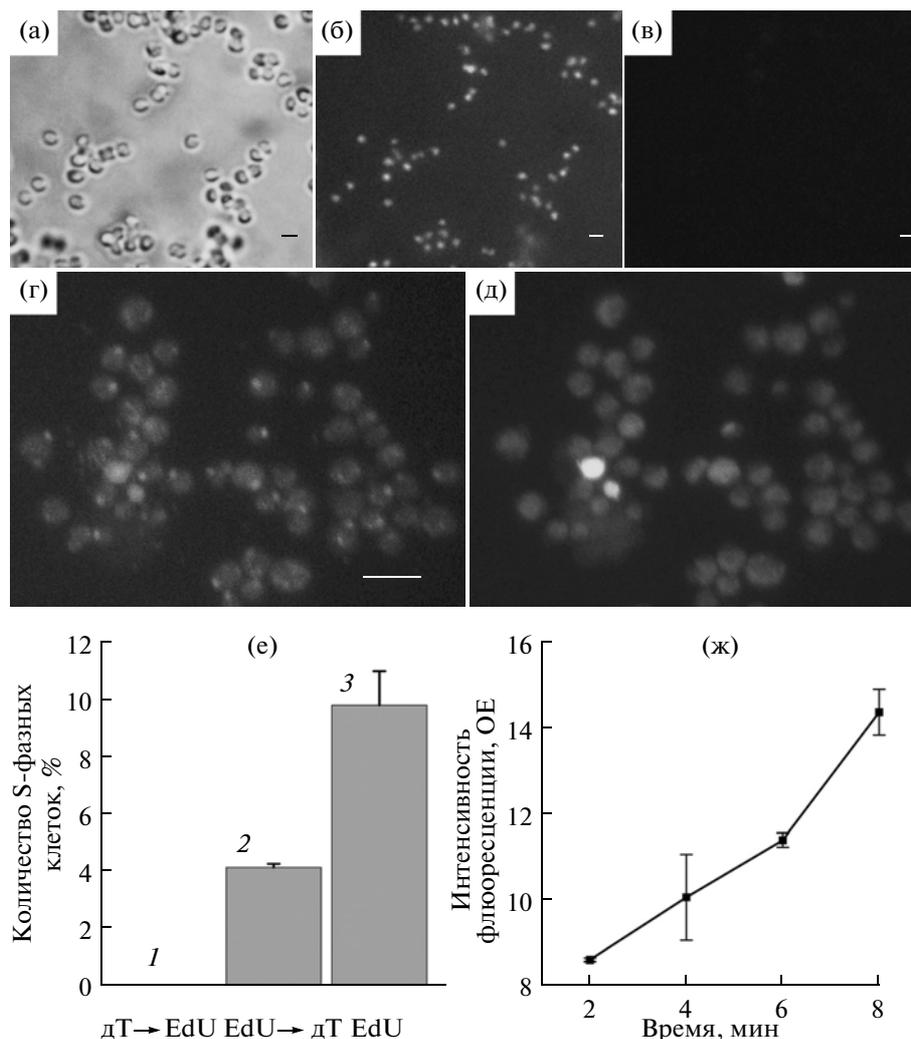


Рис. 1. Выявление включившегося в ДНК EdU в зависимости от наличия ТК, конкурентное ингибирование дТ включения EdU и анализ фосфорилирования EdU в клетках *in vivo*.

Клетки *Synechocystis* sp. (а–в) и *Chlamydomonas reinhardtii* (г, д) инкубировали с 20 мкМ EdU, и включившийся в ДНК предшественник выявляли в клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488. а – проходящий свет; б, г – окраска DAPI; в, д – Alexa Fluor 488. Клетки *Arabidopsis* Col-0 (е) перед выделением протопластов инкубировали либо с дТ, затем с EdU (1), либо с EdU, затем с дТ (2), либо только с EdU (3). Включение EdU выявляли в клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488; ж – динамика образования фосфатов EdU в клетках *Arabidopsis* Col-0 *in vivo* (см. раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ). Масштабная линейка: 2 мкм (а–в) и 30 мкм (г, д).

минутной инкубацией с EdU (20 мкМ) с последующим выделением протопластов (1.5 ч) не было выявлено S-фазных клеток. Если дТ добавляли к клеткам после 30-минутной инкубации с EdU, то выявляли 4% S-фазных клеток, а без добавления дТ их количество возрастало до 10%, т.е. в процессе выделения протопластов клетки продолжали синтезировать ДНК.

Поскольку фосфорилирование EdU необходимо для его включения в ДНК, мы предлагаем использовать этот аналог дТ для изучения динамики фосфорилирования дезоксирибонуклеозидов в клетках *in vivo*. Сущность метода состоит в инкубации клеток с EdU, быстром отборе проб и их

фиксации замораживанием, выделении клеточного сока, содержащего EdU и его фосфорилированные производные, клик-реакции EdU и EdU-фосфатов с азидом Alexa Fluor 488, избирательном осаждении фосфорилированных соединений EdU-Alexa Fluor 488 с помощью LaCl_3 и измерения флуоресцентного сигнала. Культивируемые клетки *Arabidopsis* Col-0 быстро фосфорилировали EdU (рис. 1ж). В данном случае интенсивность флуоресценции измеряли с помощью Turboo Imager и получили хорошую сходимость данных из двух независимых экспериментальных динамик. Очевидно, EdU можно применять вместо меченого тритием дТ для анализа активно-

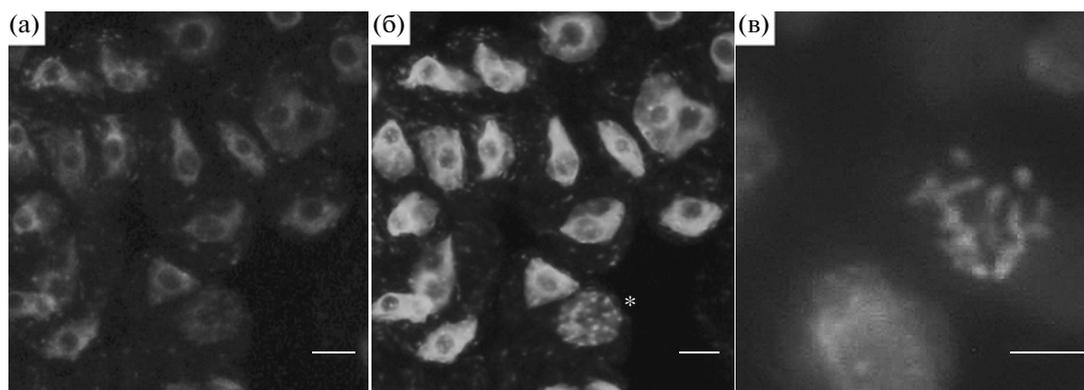


Рис. 2. Выявление включившегося в ДНК EdU после длительной инкубации с нуклеозидом.

Клетки *Arabidopsis* Col-0 (а, б) инкубировали 48 ч и прорастающие семена *Vigna radiata* (в) 24 ч с 10 мкМ EdU, затем включившийся в ДНК предшественник выявляли в клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488. а — окраска DAPI; б, в — окраска Alexa Fluor 488. Масштабная линейка 10 мкм для всех фотографий. Снежинкой (б) помечено ядро, вступившее в S-период КЦ незадолго до фиксации клеток.

сти ТК *in vitro*, а комбинации EdU с дТ и другими аналогами дТ — в исследовании субстратной специфичности ТКаз и дезоксирибонуклеозидкиназ.

Выбор концентрации EdU и времени инкубации

В работе Kotogány с соавт. [5] подробно проанализирована зависимость количества выявляемых S-фазных клеток от концентрации EdU и времени инкубации. Показано, что 15 мин инкубации с 10 или 50 мкМ EdU достаточно для выявления культивируемых клеток *Arabidopsis*, реплицирующих ДНК, тогда как при концентрации 1 мкМ необходима 30-минутная экспозиция. Для медленно растущих культур клеток было рекомендовано использовать, по крайней мере, 10 мкМ EdU и 30–60-минутную инкубацию.

В наших экспериментах для выявления S-фазного индекса мы инкубировали клетки с 10–20 мкМ EdU в течение 30–120 мин с обязательной остановкой его включения избытком дТ. Для определения пролиферативного пула популяции клеток (фракции вовлеченных в деление клеток) обычно их инкубируют с предшественником синтеза ДНК (в классических методиках с меченым тритием дТ) в течение времени, немного превышающего продолжительность КЦ, добавляя предшественник сразу или в небольших дозах с интервалами, меньшими продолжительности S-периода. Так, после инкубации с 10 мкМ EdU в течение 48 ч практически все ядра культивируемых клеток *Arabidopsis* Col-0 окрашивались Alexa Fluor 488 после клик-реакции с азидом флюорохрома (рис. 2а, 2б). Отметим, что даже через 48 ч можно было обнаружить ядра, вступившие в S-период КЦ незадолго до фиксации клеток, что

видно по характеру включения метки в виде отдельных фокусов (рис. 2б, помечено снежинкой).

В нескольких работах на клетках млекопитающих установлены факты цитотоксического действия EdU, в основном при длительных (более 24 ч) экспозициях, выражающиеся в остановке КЦ, возникновении двухцепочечных разрывов ДНК и гибели клеток [24–26], при этом эффекты EdU зависели от генотипа клеток, в частности от экспрессии белка p53. Для растений факт негативного влияния EdU отмечен в одном исследовании, где на корешках *Vicia faba* наблюдали около 3% метафаз с абберациями хромосом после синхронизации оксимочевинной клеток меристемы в S-периоде КЦ и последующей кратковременной инкубации с EdU [27].

Трехсуточная инкубация с 10 мкМ EdU культивируемых клеток *Arabidopsis* не повлияла на их жизнеспособность, определяемую по исключению красителя Erythrosin B (в контрольном варианте и в варианте с EdU было около 84% живых клеток). Экспозиция прорастающих семян *Vigna radiata* с 10 мкМ EdU в течение первых 24 ч после замачивания не приводила к остановке КЦ на ранних стадиях, поскольку мы наблюдали окрашенные Alexa Fluor 488 профазы и метафазы (рис. 2в). Тем не менее, при длительных инкубациях следует учитывать возможность цитотоксического и генотоксического действия EdU и использовать его в низких концентрациях.

Использование протопластов для выявления клеток, находящихся в S-фазе КЦ, в микроскопии и проточной цитометрии

Организм высших растений на протяжении большинства стадий онтогенеза представлен тка-

ниями, индивидуальные клетки которых механически связаны через общую клеточную стенку. Наблюдать за индивидуальными клетками в составе тканей — задача непростая. Более удобными объектами для исследования определенного круга вопросов, в том числе регуляции КЦ, могут служить суспензионные культуры клеток, состоящие из небольших клеточных агрегатов. Однако даже в этом случае из-за наложения клеточных слоев при раздавливании агрегатов клеток на цитологических препаратах возникают трудности при подсчете S-фазных клеток, выявляемых после включения EdU в ДНК и последующей клик-реакции с азидами флюорохромов. Получение протопластов представляет собой эффективный подход преобразования клеточных агрегатов в суспензию одиночных протопластов, работать с которыми гораздо удобнее, в том числе и при подсчете S-фазных клеток.

Следует отметить несколько важных моментов процедуры. Во-первых, необходимо останавливать включение EdU в реплицирующуюся ДНК путем добавления дТ к суспензии клеток в концентрации, в 10–20 раз превышающей концентрацию EdU, поскольку даже в процессе выделения протопластов EdU продолжает включаться в ДНК (рис. 1е). Во-вторых, необходимо сокращать время выделения протопластов. В предлагаемой нами смеси ферментов за 1.0–1.5 ч хорошо выделяются протопласты из культивируемых клеток многих видов растений, но важно постоянно следить за процессом выделения и не передержать выделяющиеся протопласты в растворе ферментов (лучше немного не додерживать), поскольку возможно их разрушение. В-третьих, суспензию протопластов следует фильтровать через нейлоновую сетку с ячейками, в 1.5 раза превышающими средний диаметр протопластов данной культуры, для сокращения потерь крупных протопластов и возможности сохранения для анализа одиночных клеток, из которых протопласты еще не выделились.

Мы изолировали протопласты из культивируемых клеток *Arabidopsis* после их инкубации с EdU. Фиксированные в формалине или метаноле протопласты хорошо сохраняли свою форму (рис. 3а, 3г, 3ж, 3з). Вероятно, формалиновая фиксация будет предпочтительней, если необходимо сохранить структуру и антигенные свойства цитоплазмы клетки. На препаратах протопластов после клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488 и окраски ядер DAPI легко можно дифференцировать и подсчитать количество S-фазных клеток после кратковременной или продолжительной инкубации с EdU (рис. 3а–3е).

Безусловно, проточная цитометрия — более мощный инструмент анализа событий КЦ, особенно в двухпараметрическом варианте, когда параллельно с разделением по плоидности можно определить фракцию ядер, реплицирующих ДНК [5, 10, 28]. Для двухпараметрической проточной цитометрии (ДППЦ), как правило, используют суспензию ядер, изолированных из свежих или фиксированных тканей и клеток, предварительно проинкубированных с BrdU [28]. Для определения количества ДНК в ядрах обычно применяют интеркалирующий краситель PI (в отличие от DAPI, PI не имеет селективного сродства к составу оснований ДНК), а ядра, находящиеся в S-периоде КЦ, выявляют с помощью специфичных к BrdU антител и вторичных антител, меченных каким-либо флюорохромом. Недавно для клеток млекопитающих был предложен вариант ДППЦ, в котором BrdU заменили на EdU, а трудоемкую процедуру иммунодетекции BrdU на клик-реакцию EdU с азидами флюорохромов [24]. Появились первые работы на клетках и тканях растений, в которых для ДППЦ применяли EdU и получали суспензию ядер из свежего или фиксированного материала [5, 10].

К использованию протопластов для анализа КЦ методом ДППЦ многие исследователи относятся скептически [5, 29], указывая на длительность процесса изолирования протопластов и на плохое качество гистограмм распределения протопластов по количеству ДНК. Как уже рассматривалось выше, время изолирования протопластов можно значительно сократить, оптимизируя состав смеси ферментов, однако значительное влияние на качество гистограмм распределения протопластов по количеству ДНК оказывает способность PI окрашивать РНК. Вне зависимости от способа фиксации протопластов, изолированных из культивируемых клеток *Arabidopsis* после инкубации с EdU, клик-реакция с азидом Alexa Fluor 488 четко выявляет S-фазные ядра, зеленая флюоресценция которых окружена красной флюоресценцией цитоплазмы, интенсивно прокрашиваемой PI (рис. 3ж, 3з). В протопластах, предварительно обработанных РНКазой (до клик-реакции и окраски ДНК), практически полностью исчезает окрашивание цитоплазмы (рис. 3и), и на препаратах таких протопластов можно четко дифференцировать S-фазные ядра (рис. 3л, 3м). Подготовленные таким образом протопласты и окрашенные PI или 7-AAD, либо протопласты без обработки РНКазой и окрашенные DAPI или ММС (рис. 3б, 3в, 3к) пригодны для ДППЦ. На однопараметрической гистограмме (рис. 4) распределения протопластов по количеству ДНК (окраска PI) хорошо выделяются пики, соответ-

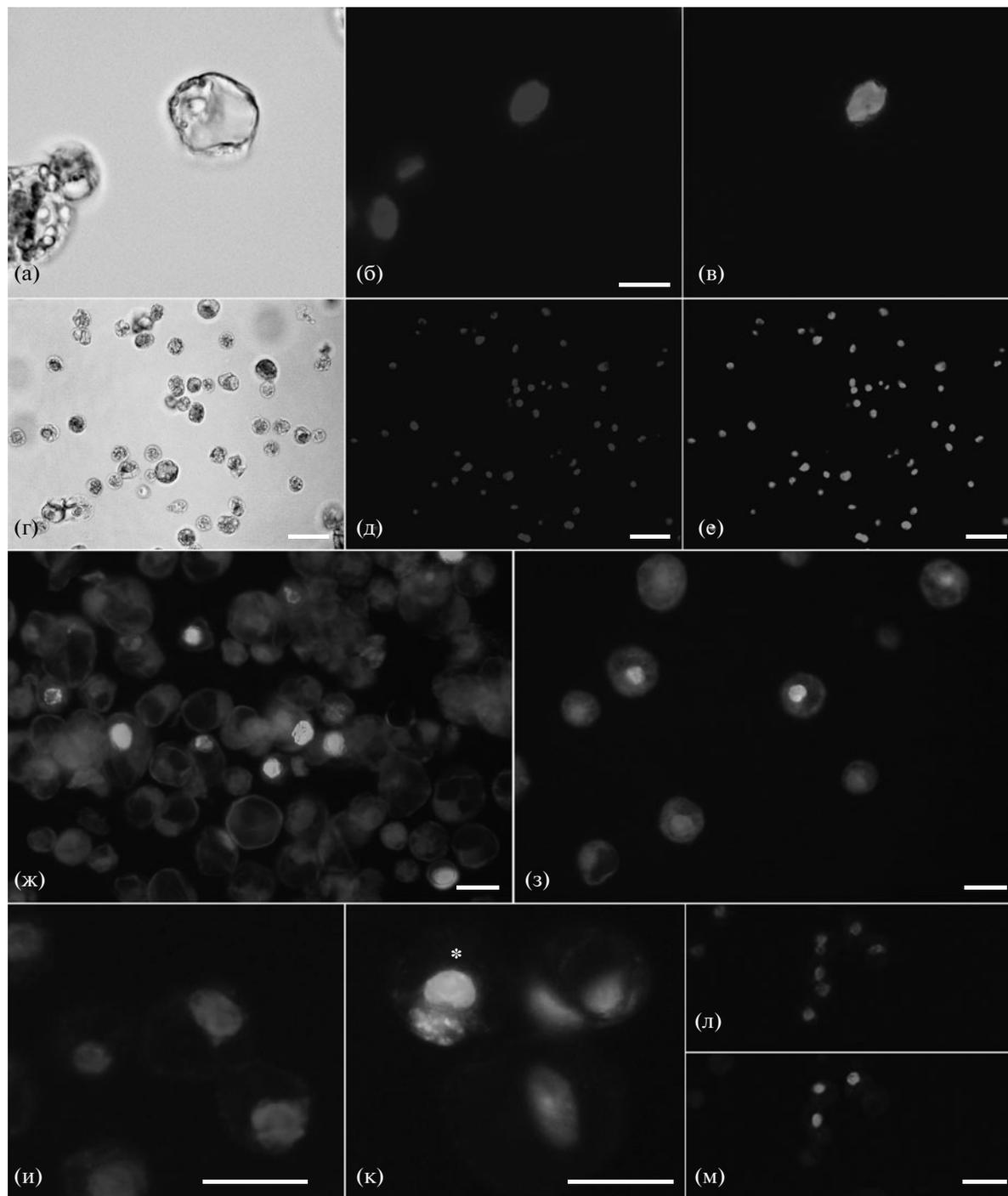


Рис. 3. Использование протопластов для выявления клеток, находящихся в S-фазе КЦ.

Протопласты изолировали из клеток *Arabidopsis* Col-0 (а–в, ж, и, л, м) и клеток *Arabidopsis ein2-1* (г–е, з, к) после инкубации с EdU в концентрации 20 мкМ (а–в, ж–м) или 10 мкМ (г–е) в течение 1 ч (а–г, ж–к), 3 ч (л, м) или 48 ч (г–е). Протопласты фиксировали в 70% метаноле (а–е, з–м) или в формалине (ж), и включившийся в ДНК EdU выявляли в клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488 без предварительной обработки протопластов РНКазой (ж, з) или после обработки РНКазой (а–е, и–м). ДНК дополнительно окрашивали DAPI (а–е), PI (ж–и, л, м) или ММС (к). а, г – проходящий свет; б, д, ж–л – окраска ДНК; в, е, ж, з, к, м – Alexa Fluor 488. Масштабная линейка: 10 мкм (а–в), 50 мкм (г–е) и 20 мкм (ж–м). Снежинкой (к) помечено ядро с зеленой флюоресценцией Alexa Fluor 488 в окружении ядер с желтой флюоресценцией ММС.

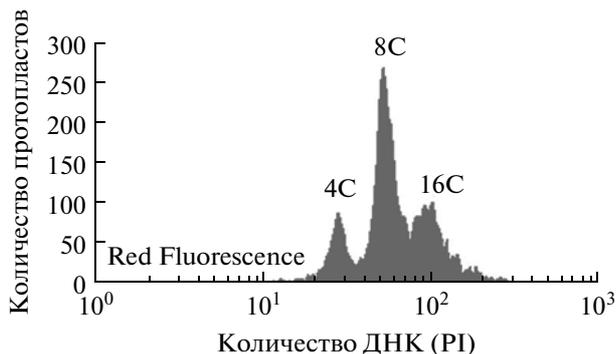


Рис. 4. Гистограмма распределения протопластов культивируемых клеток *A. thaliana ein2-1* по количеству ядерной ДНК после однопараметрической проточной цитометрии.

Протопласты окрашивали PI после предварительной обработки РНКазой.

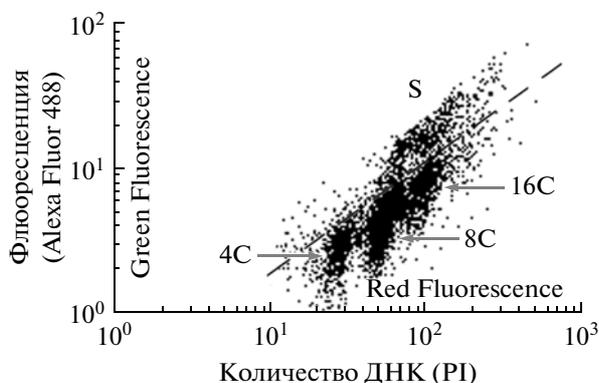


Рис. 5. Результаты ДППЦ протопластов культивируемых клеток *A. thaliana ein2-1* после выявления включившегося в ДНК EdU в клик-реакции с азидом Alexa Fluor 488 и окраски ядер PI.

Над штриховой линией расположен кластер протопластов (S), содержащих метку EdU-Alexa Fluor 488, интенсивность зеленой флюоресценции которых значительно отличается от флюоресценции плотно расположенных точек внизу от штриховой линии.

ствующие 4C, 8C и 16C. Анализируемая популяция культивируемых клеток *Arabidopsis ein2-1* миксоплоидна, и полученные с помощью проточной цитометрии данные хорошо совпадают с результатами двухволновой цитофотометрии клеток этого штамма после окраски по Фельгену (данные не приведены). Результаты ДППЦ, представленные в виде точечной диаграммы (рис. 5), хорошо демонстрируют наличие кластера протопластов, содержащих метку EdU-Alexa Fluor 488 (S, протопласты, синтезирующие ДНК), интенсивность зеленой флюоресценции которых значительно отличается от флюоресценции плотно расположенных точек (рис. 5, вверху и внизу от штриховой линии соответственно).

Таким образом, протопласты, изолированные из клеток после инкубации с EdU и клик-реакции с азидом флюорохромоов, могут быть с успехом использованы для выявления S-фазных клеток с помощью микроскопического анализа и служить альтернативой изолированным ядрам в ДППЦ даже при работе с миксоплоидной популяцией клеток.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00333) и Российского научного фонда (грант № 14-24-00020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis // *Annu. Rev. Biochem.* 1988. V. 57. P. 349–374.
2. Möhlmann T., Bernard C., Hach S., Neuhaus H.E. Nucleoside transport and associated metabolism // *Plant Biol.* 2010. V. 12. Suppl. 1. P. 26–34.
3. Taylor J.H., Woods P.S., Hughes W.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1957. V. 43. P. 122–128.
4. Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 2415–2420.
5. Kotogány E., Dudits D., Horváth G.V., Ayaydin F. A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine // *Plant Methods.* 2010. V. 6 (5). doi 10.1186/1746-4811-6-5
6. Cavanagh B.L., Walker T., Norazit A., Meedeniya A.C.B. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis // *Molecules.* 2011. V. 16. P. 7980–7993.
7. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes // *Angew. Chem.* 2002. V. 114. P. 2708–2711.
8. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 3057–3064.
9. Vanstraelen M., Balaban M., Da Ines O., Cultrone A., Lammens T., Boudolf V., Brown S.C., De Veylder L., Mergaert P., Kondorosi E. APC/C^{CCS52A} complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 11806–11811.
10. Bass H.W., Wear E.E., Lee T.-J., Hoffman G.G., Gumber H.K., Allen G.C., Thompson W.F., Hanley-Bowdoin L. A maize root tip system to study DNA replication programmes in somatic and endocycling nuclei during plant development // *J. Exp. Bot.* 2014. doi 10.1093/jxb/ert470
11. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and di-

- cotyledonous plant cell cultures // *Canad. J. Bot.* 1972. V. 50. P. 199–204.
12. *Rippka R.* Isolation and purification of cyanobacteria // *Methods Enzymol.* 1988. V. 167. P. 3–27.
 13. *Gorman D.S., Levine R.P.* Cytochrome *f* and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1965. V. 54. P. 1665–1669.
 14. *Wolcott R.M., Colacino J.M.* Detection of thymidine kinase activity using an assay based on the precipitation of nucleoside monophosphates with lanthanum chloride // *Anal. Biochem.* 1989. V. 178. P. 38–40.
 15. *Pollard P.C., Moriarty D.J.* Validity of the tritiated thymidine method for estimating bacterial growth rates: Measurement of isotope dilution during DNA synthesis // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 48. P. 1076–1083.
 16. *Watanabe S., Ohbayashi R., Shiwa Y., Noda A., Kanesaki Y., Chibazakura T., Yoshikawa H.* Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 83. P. 856–865.
 17. *Hua H., Kearsey S.E.* Monitoring DNA replication in fission yeast by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39: e60. doi 10.1093/nar/gkr063
 18. *Gristwood T., Duggin I.G., Wagner M., Albers S.V., Bell S.D.* The sub-cellular localization of *Sulfolobus* DNA replication // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. 5487–5496.
 19. *Swinton D.C., Chiang K.S.* Characterization of thymidine kinase and phosphorylation of deoxyribonucleosides in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Mol. Gen. Genet.* 1979. V. 176. P. 399–409.
 20. *Hotta Y., Stern H.* Inducibility of thymidine kinase by thymidine as a function of interphase stage // *J. Cell Biol.* 1965. V. 25. P. 99–108.
 21. *Hofman J., Schwarz O.J.* Thymidine phosphorylation in wheat. Analysis of phosphate transfer from ATP to thymidine // *Plant Physiol.* 1978. V. 62. P. 930–932.
 22. *Носов А.В.* Тимидинкиназа в клетках высших растений. 3. Свойства фермента из проростков корневых бобов // *Физиология растений.* 1995. Т. 42. С. 746–753.
 23. *Clausen A.R., Girandon L., Ali A., Knecht W., Rozpedowska E., Sandrini M.P.B., Andreasson E., Munch-Petersen B., Piškur J.* Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS J.* 2012. V. 279. P. 3889–3897.
 24. *Diermeier-Daucher S., Clarke S.T., Hill D., Vollmann-Zwerenz A., Bradford J.A., Brockhoff G.* Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry // *Cytometry. Part A.* 2009. V. 75A. P. 535–546.
 25. *Qu D., Wang G., Wang Z., Zhou L., Chi W., Cong S., Ren X., Liang P., Zhang B.* 5-Ethynyl-2'-deoxycytidine as a new agent for DNA labeling: detection of proliferating cells // *Anal. Biochem.* 2011. V. 417. P. 112–121.
 26. *Ciešlar-Pobuda A., Łos M.J.* Prospects and limitations of “click-chemistry”-based DNA labeling technique employing 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) // *Cytometry. Part A.* 2013. V. 83A. P. 977–978.
 27. *Schubert I., Schubert V., Fuchs J.* No evidence for “break-induced replication” in a higher plant – but break-induced conversion may occur // *Front. Plant Sci.* 2011. V. 2. doi 10.3389/fpls.2011.00008
 28. *Lucretti S., Nardi L., Nisini P.T., Moretti F., Gualberti G., Doležel J.* Bivariate flow cytometry DNA/BrdUrd analysis of plant cell cycle // *Methods Cell Sci.* 1999. V. 21. P. 155–166.
 29. *Galbraith D.W.* Protoplast analysis using flow cytometry and sorting // *Flow Cytometry with Plant Cells / Eds. Doležel J., Greilhuber J., Suda J. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007. P. 231–250.*