

9. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its bouyant density in CsCl // J. Mol. Biol.—1962.—4, N 3.— P. 430.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
11. Kleinschmidt A. K. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules // Meth. Enzymol.—1968.— 12b.— 361 p.
12. Юсупов Т. Ю. Сравнительное исследование структурной организации ДНК хлопчатника некоторых видов хлопчатника: Дис. ... канд. биол. наук.— Ташкент, 1982.— 119 с.

Ин-т експерим. біології рослин АН Узбекистану,
НВО «Біолог», Ташкент

Одержано 03.07.91

УДК 575.113.1—575.155—577.113.083

Ю. В. Пацковський, В. В. Гайдук, О. В. Веселовський, О. І. Зубко,
Т. П. Пастернак, Л. М. Юркевич, С. Г. Машталер, А. І. Потопальський

ВИЯВЛЕННЯ *pUC19*-ГОМОЛОГІЧНИХ ПОВТОРЮВАНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ГЕНОМІ ДЕЯКИХ ВИДІВ ВИЩИХ РОСЛИН

За допомогою методу блот-гібридації за Саузерном у складі ядерної ДНК кількох видів вищих рослин (*Secale cereale*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Solanum nigrum*, *S. tuberosum*, *Atropa belladonna*, *Lycopersicon esculentum*) виявлено послідовності, що повторюються, гомологічні ДНК плазміді *pUC19*. У складі геномної ДНК жита і красавки вони розміщені у вигляді кластерів. Встановлено розбіжності у числі та організації *pUC*-повторів в геномах різних видів і окремих ліній (поколінь — у жита) одного виду. Показано можливість використання *pUC*-повторів як маркерів при соматичній гібридації беладонни та тютюну. Обговорюється можливий зв'язок виявлених фактів з нестабільністю генома рослин.

Вступ. Кількість послідовностей, які повторюються, у геномі рослин дуже велика і звичайно складає більше 98 % усієї геномної ядерної ДНК. Причому відносна кількість повторів у геномі вищих рослин значно (у 10 і більше разів) перевищує таку у переважної більшості видів тварин [1]. Роль і значення окремих одиниць геному, що повторюються, таких як генів рРНК, гістонів, тРНК, досить відомі. Проте для основної маси повторів їх роль і структура зовсім нез'ясовані. Внаслідок цього послідовності геному рослин, які повторюються, досить інтенсивно вивчаються. Рядом дослідників були виділені й охарактеризовані як кластеровані, так і дисперговані повторювані елементи геному рослин, наприклад, тютюну, *Nicotiana tabacum* [2], томатів, *Lycopersicon esculentum* [3, 4], *Arabidopsis thaliana* [5], жита, *Secale cereale* [5, 7], *Mb01*-повтори у п'яти видів вищих рослин [8], елементи сателітної ДНК, що повторюються [9, 10]. Інтерес дослідників обумовлений фактами виявлення відмін у числі, розташуванні або величині гомологічних повторів у геномах окремих видів та родин рослин. Така варіабельність свідчить про особливу роль повторів у складі геномів та про певну нестабільність останніх. У межах одного й того ж виду рослин варіації у числі й розташуванні повторюваних одиниць звичайно не виявляються, що є підставою для проведення так званої «геномної дактилоскопії», у тому числі з використанням ДНК фага *M13* як молекулярного зонду [11].

Проводячи гібридацію з різними ДНК-зондами, які вбудовані в ДНК плазміді *pUC19*, ми виявили, що існує значна імовірність наявності у геномі рослин послідовностей, гомологічних плазмідній ДНК. Оскільки не виключена можливість використання таких послідовностей як геномних маркерів при статевій і соматичній гібриди-

© Ю. В. ПАЦКОВСЬКИЙ, В. В. ГАЙДУК, О. В. ВЕСЕЛОВСЬКИЙ, О. І. ЗУБКО,
Т. П. ПАСТЕРНАК, Л. М. ЮРКЕВИЧ, С. Г. МАШТАЛЕР, А. І. ПОТОПАЛЬСЬКИЙ, 1992

зації, ми провели дослідження з виявлення *pUC*-гомологічних повторів у геномі деяких видів вищих рослин.

Матеріали і методи. Лінії та сорти рослин, використані у роботі. В експериментах використовували:

а) жито, *S. cereale*, сорту Житомирська (лінія С) та лінії, отримані з цього сорту: короткостеблова лінія В і лінія А, яка має антоціанову пігментацію, покоління F_2 і F_4 ;

б) дві лінії (1 і 2) кукурудзи, *Zea mays*, сорту PLS-72;

в) пшениця, *Triticum aestivum*, сорту Сибірська 18 та Миронівська ярова;

г) тютюн, *N. tabacum*, сортів Лехія та Самсун;

д) паслін чорний, *Solanum nigrum* sp. (лінії 1—3);

е) томати, *L. esculentum*, сорту К-139;

є) картопля, *S. tuberosum*, сорту Зарево;

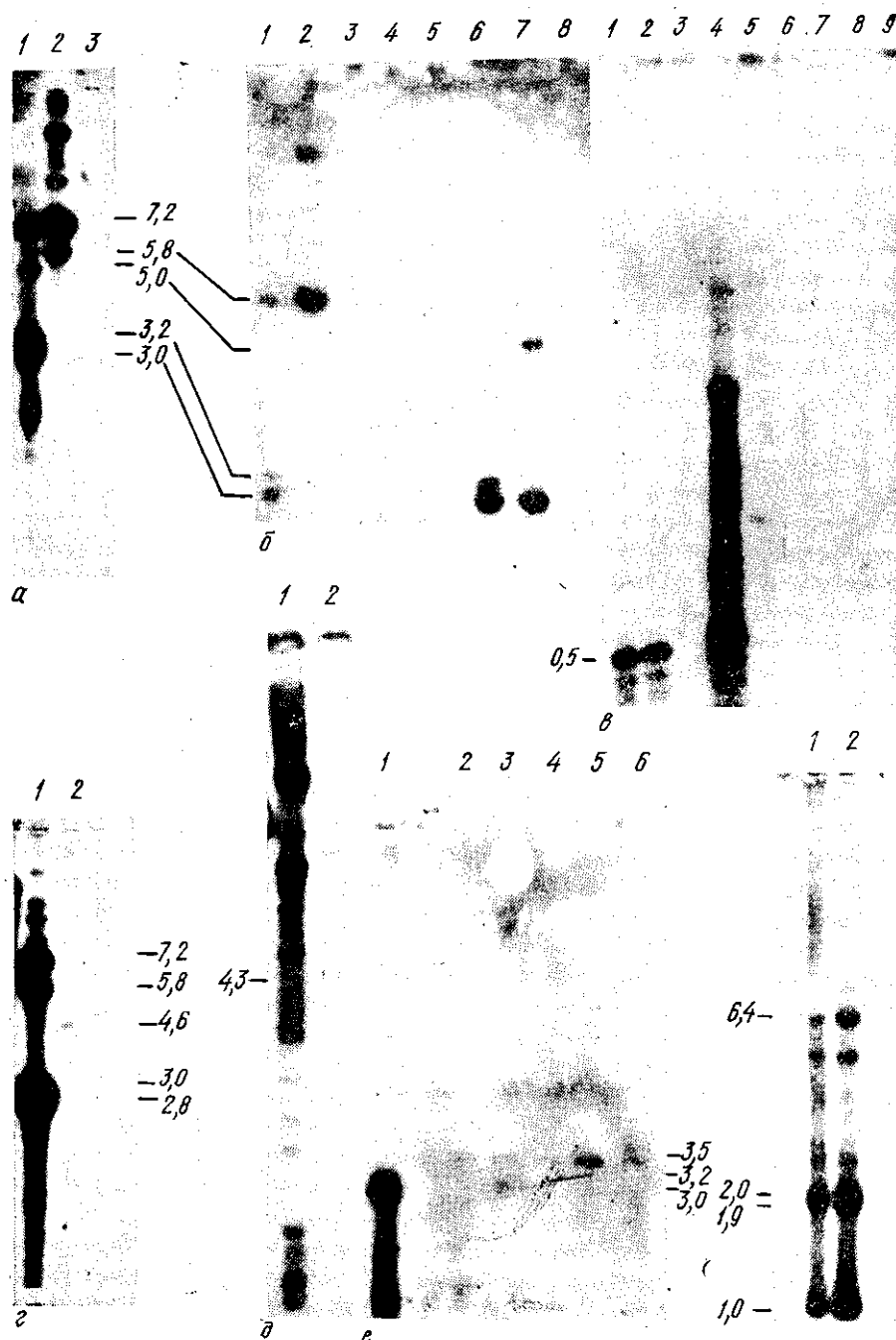
ж) культура тканини *Atropa belladonna* 100-01 та соматичного гібриду *A. belladonna* 100-01+*N. tabacum* R100a (Rab 2-1). Методику проведення робіт з культурами названих рослин наведено у [12].

Виділення та рестрикційний аналіз препаратів ДНК. Клітинні ядра отримували з 10—15-денних паростків рослин, з листя окремих рослин у процесі вегетації або з культури клітин за методом [13]. Для виділення ДНК клітинні ядра лізували у буфері такого складу: 100 мМ трис-НСІ (рН 8), 10 мМ ЕДТА, 2 % $DS-Na$ при 40 °С. Потім до лізату вносили 5 М NaCl до кінцевої концентрації 1 М і центрифугували при 0 °С (8000—12 000 *g* 20 хв). Супернатант осаджували двома об'ємами ізопропанолу, а препарат ДНК збирали, промивали 70 %-м розчином етанолу, підсушували у повітрі та розчиняли у буфері ТЕ (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, рН 7,2). Потім препарат обробляли РНК-азою А (100 мкг/мл), попередньо прогрітої при 90 °С на протязі 10 хв. Домішки білка видаляли очищенням фенолом. Після очищення препарат переосаджували етанолом, промивали 70 %-м етанолом, підсушували і розчиняли у буфері ТЕ. Рестрикцію ДНК провадили, як наведено у посібнику [14]. Використовували ферменти НВО «Біолар» (Вільнюс). Електрофорез ДНК здійснювали у 1 %-й агарозі фірми «Bio-Rad» (США) у буфері ТАЕ×1 [14] на протязі 16—20 год при силі току 12 мА і напрузі 2 В/см. На кожен доріжку наносили біля 5—7 мкг рестриційованої ДНК. Повноту рестрикції рослинної ДНК перевіряли шляхом внесення до проб ДНК фага лямбда або наступною гібридизацією отриманого фільтру з зондом 7R. Останній містить фрагмент гену 25S рДНК і отриманий від наукового співробітника Ін-ту клітин. біології і генет. інженерії АН України М. М. Борисюка. Після закінчення електрофорезу гелі забарвлювали водним (2 мг/л) розчином бромистого етидіуму і фотографували в ультрафіолеті.

Плазмідну ДНК отримували з *E. coli* JM109 за загальноприйнятим методом [14]. Електрофорез обробленої рестриктазами плазмідної ДНК провадили у 6—8 %-у поліакриламідному гелі (ПААГ) на протязі 1,5—2 год у буфері ТАЕ×1 при напрузі 10—12 В/см.

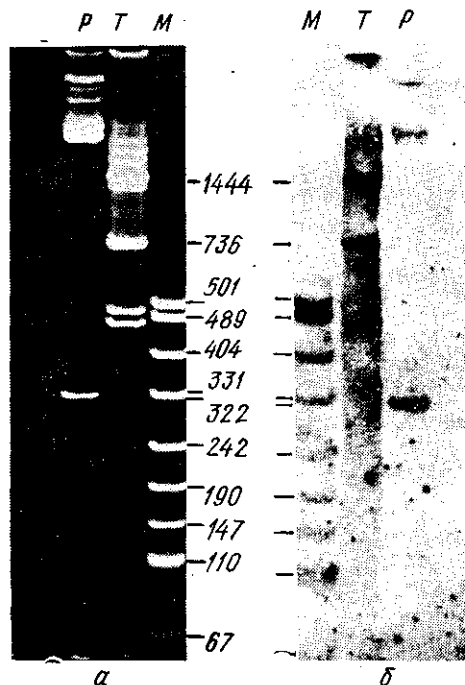
Блот-гібридизація ДНК. Перенесення на фільтри Nubond N («Amersham», Англія) та нік-трансляцію ДНК здійснювали, як наведено у [14], використовуючи стандартні розчини і ферменти фірми «Amersham». Гібридизацію ДНК-ДНК вели за методикою [15].

Результати і обговорення. Блот-гібридизаційний аналіз виявив наявність різних за частотою стрічання і характером організації *pUC*-гомологічних елементів, які повторюються, у геномі рослин. У декількох видів рослин, за виключенням тютюну, виявлені такі повтори. Аналіз геномної ДНК лінії жита (покоління F_2) показав наявність *pUC*-гомологічних повторів з відмінною організацією. Рестриктази *EcoRI* і *EcoRV* вирізують з ядерної ДНК повтори довжиною 3,0; 3,2; 5,8 і 7,2 тис. п. н., причому у лінії А мажорний клас повторів представлений послідовностями довжиною 3,0 і 3,2 тис. п. н., а в лінії В — 5,8 і 7,2 тис. п. н. (мал. 1, а, б). У той же час рестрикція *VamHI* ви-



Мал. 1. Блот-гібридизація за Саузерном препаратів рослинної ДНК з ^{32}P -міченою ДНК плазмиди *rUC19*: а — рестрикція *EcoRI* (ДНК жита: 1 — лінія А, 2 — лінія В, 3 — лінія С, усі F_2); б — рестрикція *EcoRI* (1–3) і *BamHI* (4–8) (ДНК жита: 1, 6 — лінія А, 2, 7 — лінія В, 3, 8 — лінія С, усі F_2 ; ДНК тютюну: 4 — сорту Лехія, 5 — сорту Самсун); в — рестрикція *MspI* (ДНК жита: 1 — лінія А, 2 — лінія В, 3 — лінія С, усі F_2 ; ДНК пасльону: 4 — лінія 1, 6 — лінія 2, 7 — лінія 3; 5 — ДНК картоплі, 8, 9 — ДНК томата); г — рестрикція *EcoRI*: 1 — ДНК пасльону (лінія 1), 2 — ДНК томата К-139; д — рестрикція *HindIII*: пшениця, 1 — сорт Сибірська 18, 2 — сорт Миронівська ярова; е — рестрикція *BamHI* (ДНК жита: 1 — лінія В, F_2 ; 2 — лінія С, 3 — лінія В, 4 — лінія А, усі F_4 ; ДНК кукурудзи: 5 — лінія 1, 6 — лінія 2); ж — рестрикція *EcoRI* ДНК беладонни (1) і гібриду беладонна+тютюн Rab2-1 (2). Помічено довжину фрагментів ДНК (у тис. п. н.)

являє наявність двох основних груп повторів у лінії А і В — 3,0 і 3,2 тис. п. н. в лінії А і 3,0 та 5,8 тис. п. н. в лінії В. Не виключено, що великі розбіжності у характері гідролізу повторів трьома рестриктазами обумовлені різною доступністю рестрикційних сайтів розщеплення, що може бути пов'язано, наприклад, з метилуванням ДНК. Непрямим підтвердженням гомології зазначених послідовностей є характер гібридизації *MspI*-субповторів ДНК жита, де розбіжностей не виявлено (мал. 1, *в*). В ДНК пасльону зустрічається більш значна кількість *MspI*-субповторів, гомологічних плазмідній ДНК (мал. 1, *в, г*). З іншого боку, *pUC*-гомологічні послідовності з розряду частих повторів виявляються лише у складі геномної ДНК однієї з ліній пасльону *S. nigrum* і відсутні у складі двох інших (мал. 1, *в*). Аналогічні дані отримано при вивченні геномної ДНК різних сортів пшениці — тільки у складі одного з них було знайдено часті *pUC*-гомологічні послідовності ДНК (мал. 1, *д*). За даними дот- і блот-гібридизації у присутності відомих концентрацій плазмідної ДНК встановлено, що *pUC*-гомологічні послідовності, що повторюються,



Мал. 2. Електрофорез (а) і блот-гібридизація (б) ДНК плазмиди *pUC19* з ^{32}P -міченою ДНК беладонни: Р — рестрикція *PvuII*, Т — *TaqI*, М — *MspI*. Помічені розміри фрагментів ДНК (в п. н.)

присутні або у вигляді частих повторів (біля 0,5—1 млн копій на геном, тобто 0,5—2 % усєї ДНК), як це спостерігається у двох ліній жита (F_2), у одного сорту пшениці, у одній лінії пасльону, у беладонни, або у вигляді середніх повторів (декілька сотен або тисяч копій на геном), наприклад, у кукурудзи, картоплі, томатів та жита (F_4).

В одних і тих же лініях жита, але взятих у другому (F_2) і четвертому (F_4) поколіннях, виявлено розбіжності у кількості й організації *pUC*-повторів (див. мал. 1, *а, в, е*). Аналіз рослин у F_4 показав наявність у складі геномної ДНК ліній А, В і С, а також у складі ДНК двох ліній кукурудзи *pUC*-гомологічної послідовності розміром біля 3,5 тис. п. н. (мал. 1, *е*). При цьому фенотипові розбіжності між тими ж самими лініями в F_2 і в F_4 відсутні. Крім того, за даними цитологічного аналізу, вивчені лінії жита мають однаковий хромосомний набір — 14. Кількість таких повторів у геномі ліній А, В і С у F_4 приблизно однакова і складає, мабуть, не більше декількох сотен копій на геном, що значно нижче кількості копій *pUC*-гомологічних послідовностей у ліній А і В в F_2 . Крім того, організація виявлених повторів в тих самих лініях у F_2 і F_4 відрізняється. Виходячи з отриманих даних можна мовити щонайменше про два припущення. Або розбіжності у кількості й організації елементів, що повторюються, відтворюють рівень видового поліморфізму, або зміна кількості повторів пов'язана з їх ампліфікацією і у наступному з їх втратою. В кожному випадку очевидно, що дані послідовності не мають прямого відношення до фенотипу рослин, тому що він не змінився. Крім того, в результаті генетичного аналізу було виявлено, що ознака антоціанової пігментації у лінії А жита наслідується як моногенна домінантна ознака.

На користь гіпотези про ампліфікацію повторів свідчить той факт, що лінія А виникла з ліній В з частотою 0,02 %. Це робить малоімовірним пояснення схожості ліній А і В у кількості й організації *pUC*-гомологічних повторів виходячи з припущення про поліморфізм.

Часті повтори, гомологічні ДНК *pUC19*, виявлені у складі геному *A. belladonna 100-01*. Підтвердженням кластерування даних повторів є та обставина, що характер їх рестрикції при гідролізі ферментами *EcoRI*, *BamHI* і *HindIII* був однаковий. Інтерес викликало те, що соматичний гібрид беладонна+тютюн, який містить лише одну або дві хромосоми беладонни на геном, дав аналогічну картину гібридизації з ДНК *pUC19* (мал. 1, ж). Це свідчить про те, що дані повтори розташовані кластерами, а їх копійність (не менше 1 % геному) передбачає, що 1 з 72 хромосом беладонни практично цілковито складається з *pUC*-гомологічних послідовностей. Яка роль таких повторів у геномі — незрозуміло, проте цю властивість можна використовувати при соматичній гібридизації й встановленні гібридної природи рослин, особливо з урахуванням того, що часті *pUC*-гомологічні повтори у складі геномної ДНК тютюну не виявлені. Видимий рестриктний поліморфізм *pUC*-гомологічних повторів беладонни пояснюється, можливо, поліморфізмом первинної структури ДНК плазмиди, яка не містить внутрішніх гомологічних ділянок достатньої довжини. Про це свідчить той факт, що гібридизація радіоактивноміченої ДНК беладонни з рестриційованою ДНК плазмиди виявляє наявність у геномі рослин послідовностей, гомологічних практично всім фрагментам плазмидної ДНК (мал. 2). Можливо, що кожному типу повторів може відповідати певна послідовність у складі ДНК *pUC19*.

Таким чином, у геномі деяких видів вищих рослин виявляються повтори, гомологічні ДНК плазмиди *pUC19*. Характер їх організації і копійність відрізняються у різних видів рослин, що, певно, може бути підставою для виявлення міжгеномних розбіжностей або схожості. Ці повтори, можливо, кластеровані. Їх поліморфізм може визначатися кількістю і розташуванням гомологічних і негомологічних ділянок за умови, що останні гібридизуються з різними послідовностями плазмидної ДНК. Зміна числа *pUC*-гомологічних повторів у геномі жита, пшениці і пасльону, певно, є виявленням нестабільності геному.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ильин Ю. В. Повторяющиеся гены эукариот // Молекуляр. биология.— 1986.— 16, № 1.— С. 229—257.
2. A *BamHI* family of highly repeated DNA sequences of *Nicotiana tabacum* / B. Kaulkova, J. Reich, R. Matyasek et al. // Theor. and Appl. Genet.— 1989.— 78, N 1.— P. 77—80.
3. Ganai M. V., Lapitan N. L., Tanksley S. D. A molecular and cytogenetical survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*) // Mol. and Gen. Genet.— 1989.— 213, N 2/3.— P. 262—268.
4. Zamir D., Tanksley S. D. Tomato genome is compared largely of fast evolving low copy number sequences // Ibid.— P. 254—261.
5. Characterization of highly repetitive sequences of *Arabidopsis thaliana* / C. R. Simoens, I. Gielen, M. V. Montagu, D. Inze // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 14B.— P. 6753—6766.
6. Jones J., Flavell R. The mapping of highly repeated DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale* // Chromosoma.— 1982.— 86, N 2.— P. 595—612.
7. Appels R., Moran L. B., Gustavson J. P. The structure of DNA from the rye (*Secale cereale*) NORRI locus and its behavior in wheat backgrounds // Can. J. Genet. and Cytol.— 1986.— 28, N 2.— P. 673—685.
8. Ranade S. A., Lagu M. D. Identification of A dispersed MBO 1 repeat family in five higher plant genome // Biosci. Repts.— 1988.— 8, N 5.— P. 435—441.
9. Deumling B. Sequence arrangement of a highly methylated satellite DNA of a plant *Scilla*: a tandemly repeated inverted repeat // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 1.— P. 338—342.
10. Kato A., Yakura K., Taniuji S. Sequence analysis of *Vicia faba* repeated DNA, the *Fok I* repeat element // Nucl. Acids Res.— 1984.— 12, N 16.— P. 6415—6426.
11. Zimmerman P. A., Lang-Unnasch N., Cullis C. A. Polymorphic regions in plant genomes detected by an *M13* probe // Genome.— 1989.— 32.— N 5.— P. 824—828.

12. Зубко М. К., Зубко Е. И., Капранов Ф. В. Индукция хлорофиллдефектных мутантов табака — маркеров для клеточной инженерии // Биополимеры и клетка. — 1991. — 7, № 4. — С. 72—79.
13. Vlatak J. Effect of different desintegration techniques and media on yield appearance of isolation nuclei // Biol. plant. — 1981. — 23, N 6. — P. 406—413.
14. Манцатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
15. Improved hybridization conditions for DNA «fingerprints» probed with M13 / D. F. Westneat, W. A. Noon, H. K. Reeve, C. F. Aquadro // Nucl. Acids Res. — 1988. — 16, N 9. — P. 4161.

Ин-т молекуляр. біології і генетики
АН України, Київ
Ин-т клітин. біології і генет. інженерії
АН України, Київ

Одержано 30.07.91

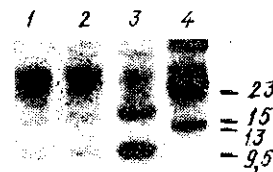
УДК 578.52

О. І. Ніколаєв, Т. Т. Чконія, К. А. Еріставі-Кафіані, В. З. Тарантул

АНАЛІЗ «ВРЯТОВАНОЇ» ПЛАЗМІДИ З ТРАНСГЕННОГО ТУТОВОГО ШОВКОПРЯДУ

За допомогою оригінальної методики мікроін'єкцій ДНК до гени тutowого шовкопряду отримано трансгенні особини. З сумарної ДНК F₂-нащадків цих тварин «врятовано» плазмиду (p_ga), котра відрізнялася за своєю структурою від перенесеної плазмиди p1.5LTR і спадкувалася позахромосомно. У складі плазмиди p_ga виявлено повторювані послідовності ДНК тutowого шовкопряду, які є еволюційно консервативними.

Вступ. При трансгенезі у тварин екзогенна ДНК частіш за все інтегрує з ядерним геном [1, 2], хоча може існувати й у екстрахромосомній формі [3, 4]. На моделі тutowого шовкопряду раніш вперше було показано, що при перенесенні плазмід шляхом мікроін'єкцій до гени вони як у першому поколінні дорослих комах (F₀), так і у наступних (F₁ і F₂) є присутніми головним чином поза хромосомною ДНК [5, 6]. Для дослідження механізму перенесення та екстрахромосомного наслідування трансгену було здійснено його клонування за допомогою метода «врятування» плазмиди [3]. У цьому повідомленні наведено дані про молекулярний аналіз однієї з «врятованих» рекомбінантних плазмід, яку отримано за трансформації клітин *Escherichia coli* ДНК з F₂-покоління трансгенного тutowого шовкопряду.



Мал. 1. Блот-гібридизація міченої p1.5LTR з нерестриційованою сумарною ДНК, виділеною з трансгенного тutowого шовкопряду № 4 (F₀-покоління) (4) та його F₂-нащадків № 8a (1), № 16a (2) і № 166 (3)

Матеріали і методи. До гени тutowого шовкопряду за допомогою оригінальної методики мікроін'єкцій [6, 7] переносили рекомбінантну плазмиду p1.5LTR, яка містить BamHI/EcoRI-фрагмент плазмиди pBR322 (3,9 тис. п. н.) та півтора довгих кінцевих повтора (LTR) вірусу саркоми Рауса (RSV) [8]. Схрещування метеликів, виділення ДНК та блот-гібридизацію провадили так, як описано раніше [7].

Результати і обговорення. За допомогою блот-гібридизації сумарної нерестриційованої ДНК з трансгенного шовкопряду № 4 з міченою плазмидою p1.5LTR встановлено, що у цій комасі (самець) міститься декілька екстрахромосомних ДНК, які відрізняються за розмі-