

В. В. Власов, Е. М. Иванова, Ю. Д. Кренделев, И. В. Кутявин,
М. И. Овандер, А. С. Райт, Ф. П. Свиначук, Л. А. Якубов

ОБОЛОЧКИ ВИРУСА СЕНДАЙ И ТЕНИ ЭРИТРОЦИТОВ — МЕМБРАННЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В КЛЕТКИ

Изучение действия алкилирующих производных олигонуклеотидов затруднено вследствие их низкой проницаемости через клеточные мембраны. В работе предложено использовать для доставки олигонуклеотидных производных в клетку реконструированные оболочки вируса Сендай и тени эритроцитов. Разработаны быстрые методы заключения олигонуклеотидных производных в мембранные везикулы, позволяющие сохранить химические свойства активных группировок. Для реагентов, заключенных в переносчики, при меньших концентрациях производных в среде достигаются степени алкилирования поли(А)+РНК в 10—100 раз большие, чем при простом добавлении олигонуклеотидных производных в клеточную суспензию.

Введение. Полученные в последнее время данные о возможности подавления олигонуклеотидами и их производными размножения вирусов и трансляции определенных мРНК свидетельствуют о перспективности таких производных, как биологически активных веществ широкого спектра действия. Применение реакционноспособных производных олигонуклеотидов представляет особый интерес, поскольку они, во-первых, могут эффективно инактивировать нуклеиновые кислоты за счет ковалентного присоединения к комплементарным нуклеотидным последовательностям и, во-вторых, использование относящихся к ним аффинных реагентов открывает возможность для детального изучения процессов взаимодействия олигонуклеотидов с клеткой: механизма транспорта в клетку и взаимодействия с клеточными биополимерами. Ранее было показано, что олигонуклеотиды и их производные захватываются клетками по механизму эндоцитоза, и эффективность этого процесса невелика [1]. Одним из подходов к увеличению эффективности доставки олигонуклеотидных производных в клетки может явиться использование мембранных переносчиков: реконструированных оболочек вируса Сендай (РОВС) и теней эритроцитов. Вещества, упакованные в мембранные везикулы, при слиянии мембран клеток доставляются непосредственно в клеточный цитозоль [2]. Описанные методы заключения веществ в мембранные переносчики неприменимы для экспериментов с реакционноспособными производными олигонуклеотидов, такими как алкилирующие производные, поскольку в соответствии с этими методами заключаемые вещества длительное время инкубируются в водных растворах, т. е. в условиях разрушения реакционноспособных производных. В настоящей работе найдены мягкие условия заключения реакционноспособных производных олигонуклеотидов в мембранные переносчики (РОВС и тени эритроцитов), исследована доставка этих производных в клетки животных и их реакция с клеточными РНК.

Материалы и методы. Олигонуклеотиды и их алкилирующие производные синтезированы по методам, описанным ранее [3, 4]. [³²P]-метку в олигонуклеотиды вводили с помощью обмена 5'-концевого фосфата, как описано в работе [5]. Выращивание вируса Сендай и очистку вирионов дифференциальным центрифугированием проводили по описанным методам [6]. Для получения [³⁵S]-меченного вируса в аллантоисный мешок во время инфекции вводили 18,5 МБк [³⁵S]метионина в 200 мкл 0,14 М NaCl. Удельная радиоактивность вируса составляла $(1 \div 5) \cdot 10^5$ нмп/мин на 1 мг вирусного белка.

РОВС получали, используя процедуру медленного диализа, как описано в работе [7], с применением либо октилглюкозида, либо его тноаналога (синтезированного Грачевой Э. А. по методу [8]), либо детергента CHAPS («Serva», ФРГ). К 200 мкл вирусной суспензии (20 % по объему, 125 мг/мл вирусного белка по Лоури) приливали 20 мкл 30 %-ного раствора детергента и после инкубации 30 мин при комнатной

температуре центрифугировали для удаления коровых вирусных частиц 20 мин при 50000 *g*. Супернатант диализировали против трех смен (по 10 мл) SSC, меняя буфер каждые 5 ч. Затем суспензию центрифугировали 20 мин при 50000 *g* для выпадения осадка вирусных оболочек.

Заключенные олигонуклеотидных производных в вирусные оболочки. К 20 мкл 50 %-ной (по объему) суспензии РОВС приливали 10 мкл раствора, содержащего 70 о. с. Λ_{280} /мл олигонуклеотидного производного [32 P]CIR (pT)₁₆ (4[(N-2-хлорэтил-N-метил)амино]бензил-5'-фосфамида гексадекатимидилата). Смесь подвергали пятикратному замораживанию в жидком азоте и оттаиванию под струей воды комнатной температуры. При проведении процедуры замораживания-оттаивания в машине оболочки и олигонуклеотидные производные предварительно переводили в 0,15 М раствор маннита, для чего олигонуклеотидное производное осаждали 10 объемами ацетона с 20 %-ным LiClO₄, промывали ацетоном, высушивали и растворяли в 0,15 М манните. РОВС в солевом растворе осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 0,15 М манните.

После последнего размораживания смесь разбавляли 300 мкл SSC и центрифугировали 20 мин при 50000 *g* и 4 °С. Далее оболочки вновь суспендировали в SSC, собирали центрифугированием, затем опять суспендировали в 200 мкл SSC и полученную таким образом суспензию РОВС с заключенным в них производным использовали для обработки клеток.

Получение теней эритроцитов и упаковка в них производных олигонуклеотидов. Образцы крови разбавляли буфером SSC и отмывали суспензию эритроцитов двукратным осаждением и ресуспендированием в этом же буфере. К 10 % (по объему) суспензии эритроцитов в SSC приливали на холоду 20 объемов буфера: 0,007 М КН₂РO₄-Na₂НРO₄, рН 7,4, 4 мМ MgSO₄, 0,5 мг/мл АТФ [9]. Полученные тени эритроцитов осаждали центрифугированием (10000 *g*, 5 мин при 2 °С) и пересаждали в буфере 2×SSC, содержащем 2 мг/мл глюкозы. Густую суспензию теней эритроцитов приливали на лед к равному объему раствора олигонуклеотидного производного, выдерживали 5 мин при 0 °С и затем инкубировали при 37 °С различное время, после чего отмывали полученную суспензию на холоду от свободного производного, оставшегося в растворе. Клетки обрабатывали тенями эритроцитов с заключенными в них олигонуклеотидными производными, добавляя к клеточной суспензии тени в количестве 0,1—0,2 объема осадка клеток и вносили в смесь 0,5 гемоглютинирующих единиц инактивированного УФ-светом вируса Сендай.

Культура клеток. В работе использованы клетки асцитной карциномы Krebs-2, перевиваемые на мышах линии CC57BR. В экспериментах с олигонуклеотидными производными концентрация клеток составляла 5·10⁶ кл/мл. После инкубации в среде Игла, содержащей олигонуклеотидные производные или мембранные переносчики, в течение 2 ч при 37 °С клетки промывали трехкратным осаждением (1000 *g*, 10 мин) и ресуспендировали в растворе Хенкса. Аликвоты клеточной суспензии просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Выделение РНК из клеток, обработанных олигонуклеотидными производными, проводили по методике, описанной в работе [10]. Для определения количества радиоактивной метки, ковалентно связанной с полимерным нуклеотидным материалом, выделенную РНК подвергали хроматографическому разделению на сефадексе G-75 в присутствии 8 М мочевины. Поли(А)⁺ РНК выделяли хроматографией полученной РНК на поли(U)-сефарозе [11]. По содержанию [32 P]-метки в полученных препаратах определяли степень алкилирования фракций РНК.

Результаты и обсуждение. Упаковка олигонуклеотидных производных в РОВС и их взаимодействие с клетками. Для упаковки ДНК в РОВС обычно используется процедура медленного диализа детергентного раствора компонентов вирусной мембраны. Реконструирующиеся в процессе удаления детергента вирусные оболочки захватывают в свой внутренний объем часть находящейся в растворе нуклеиновой кислоты [6]. Эффективность захвата нуклеиновой кислоты в вирусные оболочки при использовании такой процедуры невелика; процесс диализа занимает несколько часов или суток, что исключает возможность использования такого метода для упаковки в вирусные оболочки реакционноспособных производных нуклеиновых кислот, таких как алкилирующиеся производные. В своей работе для

подобной цели мы применили процедуру, которая может быть выполнена быстро и при пониженных температурах. Предварительно полученные «пустые» РОВС подвергали замораживанию — оттаиванию в растворе, содержащем производные олигонуклеотидов, аналогично методике, используемой для упаковки водорастворимых веществ в липосомы [12]. Замораживание — оттаивание проводили в 0,15 М растворе магния при низкой ионной силе, что позволяет повысить уровень захвата веществ в липосомы [13]. Оказалось, что в достаточно широком интер-

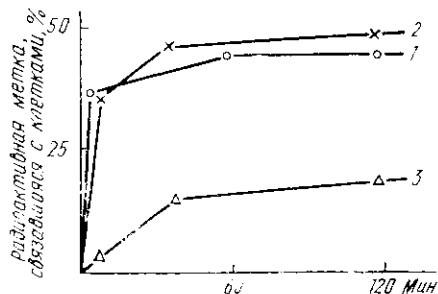


Рис. 1. Сорбция вируса Сендай и РОВС клетками Krebs-2: РОВС, 0,06 мкл осадка на 1 мл клеточной суспензии (1); вирус Сендай, 0,06 (2) и 0,3 (3) мкл осадка на 1 мкл клеточной суспензии

Fig. 1. Adsorption of Sendai virus and RSEV (reconstituted Sendai virus envelope) by ascite carcinoma Krebs 2 cells. 1 — RSEV, 0,06 μ l of pellet per 1 ml of the cell suspension; 2 — Sendai virus, 0,06 μ l of virus pellet per 1 ml of the cell suspension; 3 — Sendai virus, 0,3 μ l of virus pellet per 1 ml of the cell suspension

вале концентраций производных олигонуклеотидов (10^{-6} — 10^{-3} М) их захват в вирусные оболочки составляет 25—30 % от количества вещества, введенного в перемораживаемую смесь. Таким образом, РОВС, несмотря на наличие сложной мембранной структуры, содержащей белковые комплексы, ответственные за сорбцию и слияние частиц с клеточной мембраной, оказались способными захватывать вещества в процедуре замораживания — оттаивания, аналогично липосомам. На рис. 1 представлены кинетические кривые связывания с клетками асцитной карциномы Krebs-2 [35 S]-меченого вируса Сендай, а также вирусных оболочек, содержащих производные олигонуклеотидов. Кривая связывания вируса клетками имеет сложный характер: через 1 ч инкубации с клетками связывается около 50 % вируса, введенного в среду. Из приведенных данных видно, что при равных исходных концентрациях вирусные частицы и реконструированные вирусные оболочки связываются с клетками с близкой эффективностью. Таким образом, процедура замораживания — оттаивания не нарушает способности вирусных оболочек взаимодействовать с клетками. На рис. 2, а, приведена зависимость уровня связывания клетками упакованных в вирусные оболочки производных олигонуклеотидов от количества РОВС в среде при постоянной концентрации клеток. Видно, что взаимодействие РОВС с клетками зависит от соотношения РОВС : клетки. При низких концентрациях вирусных оболочек (до 0,1 мкл/мл при концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ кл/мл = 10 мкл/мл) связывание меченого материала за 2 ч инкубации достигает 60 % для клеток асцитной карциномы Krebs, т. е. уровень связывания примерно соответствует уровню связывания с клетками интактного вируса Сендай (рис. 1). С увеличением содержания РОВС в среде выше 0,1 мкл/мл при концентрации клеток 10 мкл/мл эффективность связывания РОВС с клетками становится ниже, очевидно, вследствие насыщения мест связывания на поверхности клеток. Однако при этом продолжает увеличиваться абсолютное количество радиоактивного материала, связанного с клетками, по-видимому, отражая процесс слияния мембран РОВС с мембраной клеток (рис. 2, б). При объемных соотношениях РОВС : клетки, превышающих 0,05—0,1, наблюдался лизис клеток. Аналогичные данные были получены для прикрепленной культуры клеток L-фибробластов мыши. Реконструированные вирусные оболочки, содержащие олигонуклеотидные производные, были стабильными в течение трехчасовой инкубации с клетками: более 90 % несвязавшегося с клетками радиоактивного материала осаждалось из культуральной жидкости 15-минутным центрифугированием при 50000 g.

Быстрая упаковка олигонуклеотидных производных в тени эритроцитов и их взаимодействие с клетками. Описанные методы нагружения теней эритроцитов водорастворимыми веществами включают две стадии: 1) лизис эритроцитов гипоосмотическим шоком с последующей отмывкой полученных теней лизирующим раствором и выдерживание на холоду в растворе с веществом, которое необходимо ввести в тени; 2) инкубация нагруженных теней в солевом растворе при 37 °С в течение 1 ч для восстановления целостности мембраны эритроцитов [2, 9].

Условия первой стадии упаковки являются достаточно мягкими для введения в тени эритроцитов реакционноспособных производных

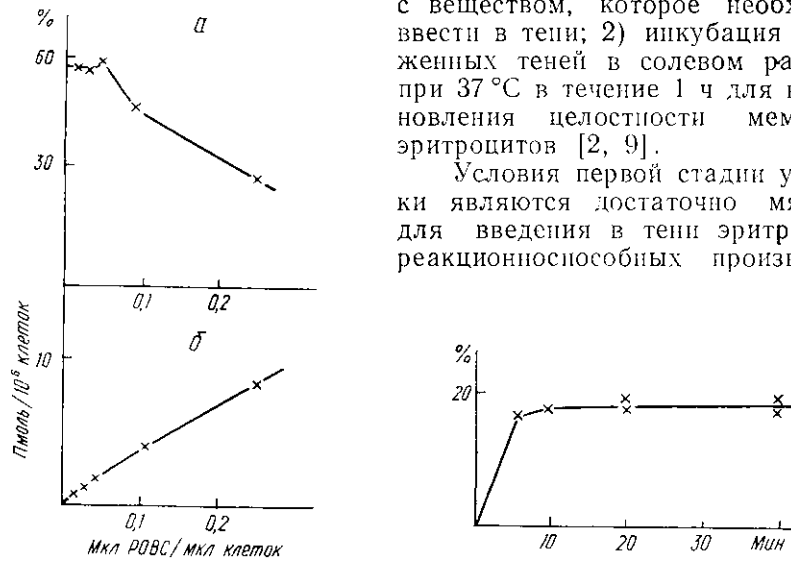


Рис. 2. Связывание клетками упакованного в РОВС CIR(pT)₁₆ (а) и то же с добавлением РОВС (б)

Fig. 2. Uptake of CIR(pT)₁₆ packed into RSVE by the ascite carcinoma cells (a) and the same with addition of RSVE (b)

Рис. 3. Зависимость количества γ -[³²P]АТФ, захватываемого тенями эритроцитов от времени инкубации при 37 °С в SSC (2 мкл осадка теней в 2×SSC инкубировали с 1 мкл γ -[³²P]АТФ (1 мМ) в SSC, затем отмывали двукратным осаждением и ресуспендированием в SSC)

Fig. 3. Amount of γ -[³²P]-ATP enclosed by erythrocyte ghosts versus the time of incubation at 37 °С in SSC buffer (2 μ l of ghosts pellet in 2×SSC were incubated with 1 μ l of γ -[³²P]ATP (1 mM) in SSC buffer, washed twice by centrifugation and resuspended in the SSC buffer)

олигонуклеотидов, если процедуры отмывки и инкубации проводить при 0 °С в солевом растворе (SSC) с глюкозой (2 мг/мл), а не в лизирующем гипоосмотическом буфере. В специальных экспериментах мы обнаружили, что применение последнего приводит к значительным потерям вещества при переводе нагруженных теней в солевой раствор.

Для того чтобы выяснить, какое минимальное время необходимо для восстановления целостности эритроцитарной мембраны, были проведены модельные опыты, в которых в тени эритроцитов включали γ -[³²P]АТФ, выдерживали их различное время при 37 °С и отмывали материал, не удерживаемый в тенях. На рис. 3 приведена зависимость уровня захвата γ -[³²P]АТФ тенями эритроцитов от времени инкубации при 37 °С. Видно, что уже пятиминутной инкубации достаточно для восстановления структуры клеточной стенки эритроцита. При добавлении полученных таким способом теней эритроцитов к суспензии клеток мы наблюдали под микроскопом типичную, описанную в литературе [2], картину взаимодействия теней эритроцитов с клетками от сорбции на поверхности клеток, появления характерных вытягиваний мембраны в виде «ушек», соответствующих частично слившимся эритроцитам, до восстановления округлых клеток. Практически все клетки при соотношении объема теней и клеток в суспензии 1 : 10 через 15 мин инкубации при 37 °С имели по 1—2 «ушка», что свидетельствовало о слиянии эритроцитарной и плазматической мембран.

Алкилирование РНК в клетках асцитной карциномы Кребса производными олигонуклеотидов, доставленными с помощью мембранных переносчиков. Чтобы убедиться в том, что слияние мембранных переносчиков с клетками приводит к введению их содержимого в клеточный цитозоль, мы провели эксперименты по алкилированию внутриклеточных РНК алкилирующими производными гексадекатимидилата (CIR(pT)₁₆), упакованными в РОВС и тени эритроцитов. Мишенями для этого реагента являются последовательности, широко представленные в мРНК клеток. В контрольных экспериментах было использовано аналогичное производное олигонуклеотида случайной структуры рТССТССССТСС (pQ)₁₆, для которого не имеется специальных последовательностей-мишеней в нуклеиновых кислотах клеток. Результаты приведенных экспериментов представлены в таблице, откуда видно, что при обработке клеток мембранными переносчиками, содержащими радиоактивные алкилирующие производные олигонуклеотидов, наблюдается включение метки в полимерную клеточную РНК. В случае производного олиготимидилата, но не производного олигонуклеотида (pQ)₁₆, фракция РНК, обогащенная поли(А)-последовательностями хроматографией на поли(У)-сефарозе, содержит на порядок больше радиоактивного материала по сравнению с препаратом суммарной РНК. Эти данные свидетельствуют о специфичности взаимодействия олигонуклеотидных реагентов с комплементарными последовательностями клеточных РНК. Из таблицы следует также, что относительное связывание реагента клетками в случае применения мембранных переносчиков составляет 25—30 % от количества реагента, введенного в инкубационную смесь с клетками, против 0,3 % при непосредственном введении реагента в культуральную среду в аналогичных условиях. Из связавшегося с клетками радиоактивного материала в случае прямой обработки клеток реагентами менее 0,07 оказывается связано с полимерной фракцией РНК. При использовании мембранных переносчиков эта величина составляет 0,25—0,3. Таким образом, можно полагать, что доставляемые мембранными переносчиками производные олигонуклеотидов более эффективно поступают в цитоплазму клеток по сравнению с производными, захваченными клетками из раствора по механизму эндоцитоза. Оценивая возможность увеличения количества реагентов, доставляемых в клетку, важно отметить,

Алкилирование РНК в клетках асцитной карциномы Кребса производными олигонуклеотидов, упакованными в мембранные переносчики

Alkylation of RNA in the ascite carcinoma Krebs cells by oligonucleotide derivatives packed into membrane vehicles

Тип переносчика	Усредненная концентрация в среде, мкМ	Связывание с клетками, %	Усредненная внутриклеточная концентрация, мкМ*	Метка полимерной РНК**, %	Степень алкилирования поли(А) ⁺ РНК***
Свободное производное CIR(pT) ₁₆	0,2	0,3	0,12	0,02	0,3 · 10 ⁻⁵
РОВС					
CIR(pT) ₁₆	0,01	25	0,41	—	1,3 · 10 ⁻⁵
—»—	0,04	25	1,7	—	8 · 10 ⁻⁵
CIR(pQ) ₁₆	0,02	28	1,0	—	7,5 · 10 ⁻⁷
Тени эритроцитов					
CIR(pT) ₁₆	0,04	30	2,1	9	2 · 10 ⁻⁴
CIR(pQ) ₁₆	0,04	41	2,7	11	3,3 · 10 ⁻⁶

* — величина определена, как отношение количества реагентов, связанных с клеткой, к объему клетки; ** — указаны проценты радиоактивного реагента, связавшегося с высокополимерной РНК, по данным хроматографии на сефадексе, от содержащегося в среде с клетками; *** — величина рассчитана на основании содержания [³²P] во фракции полимерной РНК, полученной аффинной хроматографией на поли(У)-сефарозе, как отношение молей олигонуклеотидного реагента к количеству молей нуклеотида мономера.

что концентрации реагентов в мембранных переносчиках в описанных выше опытах (150 мкМ) не являются предельными. Возможно увеличение концентраций производных в мембранных переносчиках до 1—10 мМ, при этом можно рассчитывать на пропорциональное увеличение количества материала, доставляемого в клетки. Отметим также, что при введении реагентов непосредственно в растворы при увеличении их концентрации выше 0,5—1 мкМ относительная доля связываемого клетками материала быстро падает. Таким образом, использование мембранных переносчиков позволяет добиться повышения эффективности связывания производных олигонуклеотидов с клетками и открывает возможность созданию высоких концентраций реагентов в цитоплазме клеток, позволяющих достигнуть высоких степеней модификации клеточных РНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Взаимодействие алкилирующих производных олигонуклеотидов с фибробластами мышей* / В. В. Власов, О. Е. Горохова, Е. М. Иванова и др. // Биополимеры и клетка.— 1986.—2, № 6.— С. 323—327.
2. *Celis I. E. Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer technique* // Biochem. J.— 1984.—223, N 2.— P. 281—291.
3. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. Г.* Синтез олигонуклеотидов в хлороформе триэфирным методом // Биоорг. химия.— 1983.—9, № 4.— С. 516—521.
4. *Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В.* Унифицированный вариант твердофазного триэфирного синтеза 5'-фосфорилированных олигодезоксинуклеотидов на основе β-цианэтиловых и п-хлорфениловых эфиров N-ацилнуклеозид-5'-фосфатов // Там же.— 1985.—11, № 6.— С. 815—820.
5. *Berchner K. L., Folk W. R.* Polynucleotide kinase exchange reaction *EcoRI* cleavage and methylation of DNAs containing modified pyrimidines in the recognition sequence // J. Biol. Chem.— 1977.—252, N 11.— P. 3176—3178.
6. *Fusogenic reconstituted Sendai virus envelopes as vehicle for introducing DNA into viable mammalian cells* / A. Vainstein, A. Razin, A. Graessman, A. Loyter // Meth. Enzymol.— 1983.—101.— P. 492—512.
7. *Reconstitution and fusogenic properties of Sendai virus envelopes* / M. C. Harmsen, J. Wilschut, G. Scherphof et al. // Eur. J. Biochem.— 1985.—149, N 2.— P. 591—599.
8. *Saito S., Tsuchiya T.* Synthesis of alkyl-β-D-thioglucoopyranosides, a series of new nonionic detergents // Chem. Pharm. Bull.— 1985.—33, N 2.— P. 503—508.
9. *Nash G. B., Meiselman H. J.* Effect of preparative procedure on the volume and content of revealed red cell ghosts // Biochim. et biophys. acta.— 1985.—815, N 3.— P. 477—485.
10. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—480 с.
11. *Направленная модификация полнудениловых фрагментов информационной РНК в клетках асцитной карциномы Кребс 2 алкилирующим производным нонатимидилуридина* / Е. М. Иванова, Г. Г. Карпова, Д. Г. Кнорре и др. // Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 3.— С. 613—619.
12. *Lurquin P. F.* Entrapment of genetic material into liposomes and delivery to cells // Liposome technology.— Boca Roton: CRC press, 1984.— P. 187—193.
13. *Получение липосом с лекарственными препаратами* / В. Г. Будкер, Т. Е. Вахрушева, Е. В. Киселева, Н. Б. Христолюбова // Хим. фарм. журн.— 1987.— № 3.— С. 347.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 01.03.88

SENDAI VIRUS ENVELOPES AND ERYTHROCYTE GHOSTS AS MEMBRANE VEHICLES FOR TRANSPORT OF THE REACTIVE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES INTO THE CELLS

*V. V. Vlasov, E. M. Ivanova, Yu. D. Krendelev, I. V. Kutyavin,
M. N. Ovander, A. S. Ryte, F. P. Svinarchuk, L. A. Yakubov*

Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk
Institute of Molecular Biology and Genetics
of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Poor penetration of oligonucleotide derivatives through mammalian cell membranes interferes with their action as inhibitors of cellular nucleic acid functions. This difficulty

can be overcome using reconstituted Sendai virus envelopes and erythrocyte ghosts as membrane carriers of the oligonucleotide derivatives. Fast methods for incorporation of reactive oligonucleotide derivatives into membrane carriers have been developed. In the model experiments membrane carriers incorporating alkylating oligothymidylate derivatives are delivered into ascite carcinoma Krebs 2 cells and it is shown that they are transferred efficiently into cytosol and react with complementary poly(A) sequences of cellular RNAs. Efficiency of delivery of oligonucleotide reagents into cells 10—100 times increases when using the membrane vehicles.

УДК 577.21

В. А. Вахитов, Ю. М. Никоноров

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БОЛЬШОГО ПОВТОРА 5S ДНК У ДИПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM MONOCOCCUM* L.

Определена нуклеотидная последовательность большой повторяющейся единицы 5S ДНК у диплоидной пшеницы *T. monococtum* протяженностью 485 п. н. Показано, что различия в размерах двух семейств повторов 5S ДНК у данного вида пшеницы связаны с делецией 154 п. н. в центральной области межгенного спейсера. Выявлена высокая гомология областей, кодирующих 5S рРНК, терминирующих последовательностей, 3'-концов межгенных спейсеров в обоих семействах повторов 5S ДНК, а также между повторами одинаковой протяженности у двух образцов *T. monococtum*. Установлено, что в отличие от двудольных растений у изученных видов злаков последовательность АТАТААТТА локализована ближе к 5'-концу межгенного спейсера.

В геноме диплоидной пшеницы *T. monococtum* имеются два семейства повторяющихся последовательностей ДНК, кодирующих 5S рРНК, размерами около 320 и 500 п. н. [1]. Ранее они были клонированы нами в плаزمиде *pTm5S7* и *pTm5S12* и тогда же определена нуклеотидная последовательность малого повтора 5S ДНК [1]. В настоящей работе представлена первичная структура 5S ДНК размером 500 п. н., клонированной в плазмиде *pTm5S12*.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использован диплоидный вид пшеницы *T. monococtum* (номер каталога ВИР — 8555). Методы выделения ДНК рекомбинантных плазмид, включения радиоактивной метки и определения первичной структуры клонированных фрагментов ДНК были подробно описаны нами в предыдущей работе [1].

Результаты и обсуждение. Для определения первичной структуры вставка рекомбинантной плазмиды *pTm5S12*, содержащей 5S ДНК *T. monococtum* размером около 500 п. н., была переклонирована в плазмиде *pUC19*. Нуклеотидная последовательность гена 5S рРНК и межгенного спейсера представлена на рисунке. Для сравнения приведены также первичные структуры 5S ДНК в повторах размером 320 п. н. из этого же образца и 500 п. н., клонированной в плазмиде *pTm5S73* (*T. monococtum*, к-45297 [2]).

Нуклеотидную последовательность ДНК, кодирующей 5S рРНК, идентифицировали исходя из первичной структуры 5S рРНК мягкой пшеницы, определенной МакКеем и др. [3]. Из рисунка видно, что в направлении транскрипции клонированная нами 5S ДНК содержит кодирующий фрагмент размером 90 п. н., представляющий собой 3'-конец одного гена, межгенный спейсер и фрагмент размером 30 п. н. 5'-конца гена 5S рРНК следующего повтора. Следовательно, последовательность, узнаваемая рестриктазой *BamHI*, находится внутри кодирующей области гена 5S рРНК.